

CDNA-KLONIERUNG VON HEPATITIS A-VIRUS-RNA UND EXPRESSION
EINES VIRALEN GENES IN E. COLI

Dissertation der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

durchgeführt am Max-von-Pettenkofer Institut für
Hygiene und medizinische Mikrobiologie
in München

vorgelegt von

Richard Ostermayer

aus

Dachau

Juni 1986

Erster Berichterstatter: Prof.Dr. R.J. Schweyen
Zweiter Berichterstatter: Priv.Do. Dr. W. Lubitz
Sonderberichterstatter: Priv.Do. Dr. K. von der Helm

Tag der mündlichen Prüfung: 27.10. 1986

Herstellung: Hieronymus Buchreproduktions GmbH, München

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1	1. EINLEITUNG
4	2. BIOLOGIE UND BIOCHEMIE DER PICORNAVIREN
4	2.1. Das System der Picornaviren, Struktur des Virusgenoms und Funktion der viralen Proteine
8	2.2. Antigenstruktur des Capsids der Picornaviren
12	3. EXPERIMENTELLER TEIL
12	3.1. Material
12	3.1.1. Zelllinien, Bakterienstämme und Nuklein- säuren
12	3.1.2. Geräte
12	3.1.3. Enzyme und Enzyminhibitoren
13	3.1.4. Chemikalien, Lösungsmittel und anderes Material
15	3.2. Methoden
15	3.2.1. Virusvermehrung und Virusisolation

Seite

17	3.2.2. Isolation von RNA
17	3.2.2.1. Isolation von Virus-RNA
17	3.2.2.2. Isolation von zellulärer Gesamt-RNA
18	3.2.3. Reverse Transkription von HAV-RNA
18	3.2.3.1. "Primer": oligo(dT)
18	3.2.3.2. "Primer": Zufalls-"Primer"
18	3.2.3.2.1. Herstellung des Zufalls-"Primers"
20	3.2.3.2.2. cDNA-Synthese mit Hilfe des Zufalls-"Primers"
20	3.2.3.3. Herstellung von Hybridisierungsproben mit R.T.
21	3.2.3.4. "Primer": Restriktionsenzym-Fragmente
21	3.2.4. Alkaliverdau der viralen RNA
22	3.2.5. ds-cDNA-Synthese mit Klenow-Polymerase
22	3.2.6. S1-Nukleaseverdau der ds-cDNA
23	3.2.7. Synthese von Homopoly(dC)-Enden

Seite

23	3.2.7.1. Homopoly(dC)-Synthese zur Klonierung von cDNA
23	3.2.7.2. Endmarkierung von DNA durch TdT
24	3.2.8. ds-cDNA-Synthese mit R.T.
24	3.2.9. Einbau der ds-cDNA in den Vektor pBR 322
25	3.2.10. Säulenchromatographie
25	3.2.10.1. Sephacrylsäule
25	3.2.10.2. Ultrogelsäule
25	3.2.11. Messung der Konzentration radioaktiv markierter Nukleinsäuren
25	3.2.11.1. Messung von (α - ^{32}P)dCTP
26	3.2.11.2. Messung von (^3H)dGTP
26	3.2.12. Messung der Konzentration unmarkierter Nukleinsäuren
26	3.2.12.1. Spektrophotometrie
27	3.2.12.2. Optische Schätzung der Konzentration ethidiumbromidgefärbter ds-DNA

Seite

27	3.2.13. Transformation von E. coli-Zellen
28	3.2.14. Bakterienkultur und -lagerung
29	3.2.15. Präparation von Plasmiden
29	3.2.15.1. Aufarbeitung von 1.5 ml-Kulturen
29	3.2.15.2. Aufarbeitung von 500 ml-Kulturen
30	3.2.16. Methoden der Reinigung und Verarbeitung von DNA
30	3.2.16.1. "Elutip"-Säule
30	3.2.16.2. Proteinase K-Behandlung
31	3.2.16.3. Restriktionsenzymverdau von DNA
31	3.2.16.4. Elution von DNA aus Agarosegelen
32	3.2.16.5. "Nick-translation" von DNA
32	3.2.17. Gele zur Auftrennung von Nukleinsäuren
32	3.2.17.1. Gele mit neutralem Puffer zur Auftrennung von Restriktionsenzym-Fragmenten
33	3.2.17.2. Gele mit alkalischem Laufpuffer

Seite

33	3.2.17.3. Gele zur Auftrennung glyoxaldehyd- naturierter RNA
34	3.2.17.4. PAGE für DNA
34	3.2.17.5. DNA- und RNA-Molekulargewichts-Mar- ker
35	3.2.18. Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosefilter
35	3.2.18.1. "Southern"-Blot
35	3.2.18.2. "Northern"-Transfer
36	3.2.18.3. Nitrozellulosebindung von DNA durch Auftropfen
36	3.2.18.4. Koloniehybridisierung
37	3.2.19. Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren
37	3.2.19.1. Hybridisierung mit radioaktiv mar- kierter cDNA
37	3.2.19.2. Hybridisierung mit radioaktiv markiertem poly(dT)
38	3.2.20. Fotografie und Autoradiographie

Seite

38	3.2.21. Ligation von DNA-Fragmenten
39	3.2.22. Synthese von β -Galaktosidase-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>
39	3.2.22.1. Induktion auf Agarplatten
39	3.2.22.2. Induktion in Flüssigmedium
40	3.2.23. SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen
40	3.2.24. Proteinfärbung mit Coomassie-Blau
41	3.2.25. Transfer von SDS-PAGE-separierten Proteinen auf Nitrozellulosefilter und Inkubation mit Antiseren
41	3.2.25.1. Proteintransfer
41	3.2.25.2. Herkunft bzw. Herstellung antiHAV-positiver Seren
42	3.2.25.3. Inkubation filtergebundener Proteine mit Antiseren
43	3.2.26. Präparation von bakteriellem Gesamtzellprotein für den Einsatz in einem RIA
43	3.2.27. Hepatitis A-Antigen-RIA (HAAG-RIA)

Seite

45 4. ERGEBNISSE

TEIL I

45 4.1. Reverse Transkription von HAV-RNA,
Klonierung von HAV-cDNA und physikalische
Kartierung von HAV-cDNA-Klonen

45 4.1.1. Reinigung und Reinheitsprüfung der
viralen Nukleinsäure

48 4.1.2. Reverse Transkription der HAV-RNA mit
Hilfe von oligo(dT) und Klonierung der HAV-
cDNA

48 4.1.2.1. Reverse Transkription von HAV-RNA mit
R.T. und Alkaliverdau der RNA

50 4.1.2.2. Synthese von ds-cDNA mit Klenow-
Polymerase

51 4.1.2.3. S1-Nukleaseverdau von ds-cDNA

52 4.1.2.4. 3'-Homopoly(dC)-Synthese

53 4.1.2.5. Transfektion von pBR 322-cDNA-
Hybridplasmiden in E. coli

Seite

- 54 4.1.3. Identifizierung und Grobkartierung von
oligo(dT)-geprägten cDNA-Klonen
- 61 4.1.4. Reverse Transkription von HAV-RNA mit
Hilfe von Restriktionsenzym-Fragmenten und
Klonierung von HAV-cDNA
- 61 4.1.4.1. Überbrückung der Kartierungslücke
zwischen Klon 3831 und den Klonen 2032/2470.
- 61 4.1.4.1.1. "Primer-extension" mit R.T.
- 62 4.1.4.1.2. ds-cDNA-Synthese mit Klenow-Poly-
merase und S1-Nukleaseverdau der ds-cDNA
- 63 4.1.4.1.3. 3'-Homopoly(dC)-Synthese und
Transformation von E. coli
- 64 4.1.4.2. Klonierung des Genombereichs von 6,65
Kb vom 3'-Ende des HAV-Genoms bis zum 5'-Ende
des Genoms
- 64 4.1.4.2.1. "Primer-extension"
- 66 4.1.4.2.2. Homopoly(dC)-Synthese und Synthese
von ds-cDNA mit R.T.
- 66 4.1.4.2.3. Homopoly(dC)-Synthese und Trans-
fektion der pBR 322-cDNA-Hybridplasmide in E.
coli

Seite

67	4.1.5. Prüfung der Spezifität der cDNA-Klone
68	4.1.6. Feinkartierung durch Southern-Hybridisierung und Analyse von Restriktionsenzym-Fragmenten
68	4.1.6.1. "Southern"-Hybridisierung und Festlegung des genomischen 3'-Endes.
74	4.1.6.2. Analyse von Restriktionsenzym-Fragmenten der cDNA-Klone
75	4.1.6.2.1. Verdau von Plasmidininsertionen mit einem Restriktionsenzym
76	4.1.6.2.2. Restriktionsenzym-Verdau von Gesamtplasmid-DNA
76	4.1.6.2.2.1. Vollständige Spaltung von Gesamtplasmid-DNA
76	4.1.6.2.2.2. Partielle Spaltung von Gesamtplasmid-DNA
77	4.1.6.2.3. Spaltung von cDNA-Plasmidininsertionen mit 2 Restriktionsenzymen
77	4.1.6.2.4. Vollständige Spaltung endmarkierter cDNA-Insertionen

Seite

81	4.1.6.2.5. Partielle Spaltung endmarkierter cDNA-Insertionen
83	4.1.6.3. Feinkartierung besonders intensiv studierter Genombereiche
83	4.1.6.3.1. Feinkartierung im Bereich von 2.4 Kb bis 4.05 Kb vom 3'-Ende des Genoms
84	4.1.6.3.2. Kartierung des 5'-Endes des HAV-Genoms
87	4.1.7. Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse und Homologiestudien

Teil II

91	4.2. Expression von HAV-cDNA in E.coli
92	4.2.1. Reaktionsparameter der Ligation
93	4.2.2. Auswahl des zu exprimierenden Genombereiches
93	4.2.3. Bestimmung des Leserasters der Proteinsynthese an den 2 terminalen Restriktionsenzymspaltstellen der cDNA-Insertion

Seite

94	4.2.3.1. Leserasterbestimmung durch Expression
96	4.2.3.2. Leseraster in der Nukleotidsequenz eines unabhängigen HAV-Isolats
97	4.2.4. Konstruktion von Vektoren zur Synthese von HAV-VP1 als Fusionsprotein mit β -Galaktosidase
97	4.2.4.1. Aufbau von 5 Expressionsvektoren aus cDNA-Restriktionsenzym-Fragmenten
99	4.2.4.2. Analyse des cDNA-Anteils der Expressionsvektoren nach Isolation aus den transformierten E. coli-Zellen
101	4.2.5. SDS-PAGE und "Westernblot" von Gesamtzellprotein plasmidtragender E. coli-Zellen
101	4.2.5.1. SDS-PAGE
101	4.2.5.2. Identifizierung der β -Galaktosidase-Fusionsproteine
103	4.2.5.3. Vorläufige Bestimmung des Molekulargewichts eines β -Galaktosidase-Fusionsproteins

Seite	
104	4.2.5.4. "Westernblot" filtergebundener Proteine
104	4.2.5.4.1. Die verwendeten Seren
104	4.2.5.4.2. Ergebnisse der "Westernblot"-Experimente
107	4.2.6. Radioimmuno-Assay (RIA)
109	5. ANMERKUNGEN ZU PROBLEMEN DER cDNA-SYNTHESE UND KARTIERUNG VON cDNA-KLONEN
112	6. DISKUSSION
112	6.1. Reverse Transkription von HAV-RNA, Klonierung und physikalische Kartierung der cDNA
117	6.2. Expression von HAV-cDNA in E. coli
122	6.3. Antigene Eigenschaften der HAV-VP1-Fusionsproteine
127	7. ZUSAMMENFASSUNG
129	8. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN
131	9. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

Wir unterscheiden heute 3 Formen von primären humanen Virushepatitiden, die folgendermaßen eingeteilt werden: Hepatitis A (epidemische Hepatitis mit kurzer Inkubationszeit von durchschnittlich 28 Tagen; die Übertragung erfolgt fäkal-oral).

Hepatitis B (früher häufige, heute seltene Posttransfusionshepatitis; häufige Form der nosokomialen, nicht durch Bluttransfusion verursachten Hepatitis mit langer Inkubationszeit von 3-6 Monaten).

Hepatitis Nicht A-Nicht B (sporadisch auftretend; häufigste Form der Posttransfusionshepatitis).

Über die Natur des Erregers der Hepatitis Nicht A-Nicht B ist wenig bekannt. Epidemiologie und Krankheitsbild rücken diese Form der Hepatitis in die Nähe von Hepatitis B. Das Hepatitis B-Virus (HBV) ist biochemisch sehr gut untersucht und HBV-Infektionen können seit wenigen Jahren mit einem aus dem Plasma von chronischen Antigen-trägern gewonnenen Tot-Impfstoff verhindert werden (Deinhardt, 1981; Deinhardt und Zuckerman, 1982). Außerdem zeigt eine in Hefezellen hergestellte rekombinante Vaccine (Valenzuela et al., 1982; Miyahara et al., 1983) gute Wirksamkeit. Dagegen kann der Hepatitis A nur durch kurz anhaltenden passiven Immunschutz vorgebeugt werden.

Hepatitis A stellt ein weltweites Problem dar. In vielen hygienisch schlecht versorgten Ländern erlangen die meisten Menschen schon im Kindesalter einen meist lebenslangen Immunschutz durch Infektion mit Hepatitis A-Virus (HAV), die bei jungen Menschen überwiegend eine

milde, oft nicht diagnostizierte, Form dieser Erkrankung verursacht. In den Industriestaaten treten wesentlich weniger Infektionen mit diesem Virus auf, häufig sind Touristen (in endemischen Ländern), also in der Regel Erwachsene, betroffen. Hepatitis A nimmt bei Erwachsenen meist einen klinischen Verlauf, sodaß es lohnend erscheint, einen aktiven Hepatitis A-Impfstoff zu entwickeln (Ökologie und Epidemiologie von HAV: Mosley, 1983).

Die Übertragung von HAV auf Marmosets (siehe Deinhardt, 1976), die Identifizierung von 27 nm-Partikeln in Patientenstuhl (Feinstone et al., 1973) und die erste Kultivierung von HAV in Zellkultur (Provost a. Hillemann, 1979; Frösner et al., 1979) sind Erfolge, die schließlich zur biochemischen Charakterisierung von HAV führten und die Entwicklung einer HAV-Vaccine ermöglichen (Krugman, 1982).

HAV wird heute als Enterovirus Typ 72 in der Familie Picornaviridae eingestuft (Melnick, 1982). Einige Unterschiede in der Epidemiologie (Mosley, 1983) und im Verhalten in Zellkultur (kein zytopathischer Effekt und sehr langsame Virusvermehrung: Frösner et al., 1979; Gauß-Müller et al., 1981) weisen dem Virus eine Sonderstellung innerhalb der Gruppe der Enteroviren zu, deren molekulare Ursachen weitgehend unbekannt sind. HAV kann auf Grund der erwähnten Eigenschaften nur unter hohem Zeit- und Materialaufwand in Gewebekultur propagiert und mit relativ geringen Ausbeuten isoliert werden. Daher sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch cDNA-Klonierung des HAV-Genoms die Grundlagen für eine eingehende molekularbiologische Charakterisierung von

HAV geschaffen werden. Zudem schien es nach den neueren Entwicklungen auf dem Gebiet der Impfstoffproduktion lohnend, einleitende Experimente zur Expression der viralen Capsidproteine in Prokaryonten durchzuführen.

2. BIOLOGIE UND BIOCHEMIE DER PICORNAVIREN

2.1. Das System der Picornaviren, Struktur des Virusgenoms und Funktion der viralen Proteine

Auf Grund der Dichte und der Säurestabilität des reifen Viruspartikels zerfällt die Familie der Picornaviren in 4 Genera (Cooper et al., 1978):

Genus	Säurestabilität	Dichte (g/cm^3)	S-Wert
Enterovirus	ja	1.34	155
Cardiovirus	nein	1.34	155
Rhinovirus	nein	1.40	155
Aphthovirus	nein	1.44	155

Poliovirus (PV), Coxsackievirus und Echovirus gehören zur Gruppe der Enteroviren (die sich in erster Linie im menschlichen Darmtrakt vermehren), Encephalomyocarditisvirus (EMC) und Mengovirus zu den Cardioviren (Wirt: Nager, vor allem Mäuse), Maul-und-Klauenseuchevirus (engl.: foot-and-mouth disease virus, FMDV) zu den Aphthoviren (Wirt: vor allem Rinder). Die Rhinovirusgruppe umfaßt neben wenigen tierpathogenen viele humanpathogene Vertreter (Schnupfenvirus; engl.: human rhinovirus, HRV). HAV erfüllt alle Kriterien, die für eine Zuordnung zu den Picornaviridae im allgemeinen

(s.u.) und zu den Enteroviren im speziellen gefordert werden (Coulepis et al.,1982).

Es bestehen große Unterschiede in der Anzahl der Serotypen der verschiedenen Picornaviren: PV existiert in 3, FMDV in 7 (mit mehr als 60 Subtypen), HAV wahrscheinlich in 1 und HRV in wenigstens 115 stabilen Serotypen. Die Ursachen für diese Unterschiede sind unbekannt.

Alle untersuchten Picornaviren unterscheiden sich nur geringfügig in ihrer genomischen Organisation und im Aufbau des Viruspartikels. Das am intensivsten untersuchte Picornavirus ist PV. 60 Protomere, bestehend aus je 4 Strukturproteinen VP1 (30-33 Kd), VP2 (24-27 Kd), VP3 (21-23 Kd) und VP4 (7-14 Kd), die entsprechend ihrer Anordnung im Proteinprecursor (s.u.) mit 1D, 1B, 1C und 1A bezeichnet werden (Rueckert a. Wimmer,1984), bilden ein icosaedrisches, hüllenloses Capsid, in dem ein RNA-Molekül (7-8 Kb) mit positiver Polarität, einem kovalent ans 5'-Ende gebundenen Protein und einem kurzen poly(A)-Strang (40-80 Nukleotide) am 3'-Ende des Genoms eingeschlossen ist (Rueckert,1976; Putnak a. Phillips,1981). Die RNA wird über einen langen offenen Leserahmen in ein Polyprotein übersetzt, das anschließend in einer Reihe von proteolytischen Spaltungen in die Endprodukte prozessiert wird (Baltimore et al.,1969; Summers a. Maizel,1968; Pallansch,1984). Abb.1 zeigt schematisch die Genomorganisation und die Proteinprozessierung am Beispiel von PV.

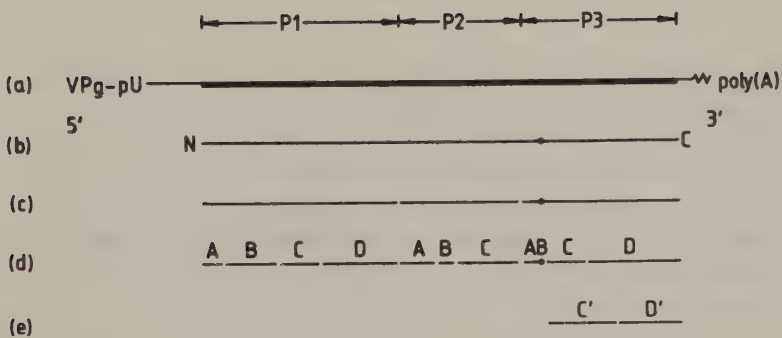


Abb. 1:

Translation der Genom-RNA und Prozessierung des Proteinprecursors (= Vorläuferprotein) am Beispiel des PV (schematisch): (a) = Virus-RNA (plus-Strang); (b) = Primäres Translationsprodukt (hypothetisch); (c) = Spaltung in die primären Produkte (P1, P2, P3); (d) = Endprodukte der bevorzugten Prozessierungswege; (e) = alternative Prozessierung von Proteinprecursor P3.

Die Protein-"Reifung" (engl. "processing") geht folgendermaßen vor sich: Das primäre Translationsprodukt (Abb.1b) wird innerhalb von wenigen Minuten in 3 intermediäre Polypeptide (P1, P2 und P3; Abb.1c) gespalten. Diese Polypeptidprodukte besitzen eine etwas längere Halbwertszeit und werden über mehrere Zwischenstufen in die reifen Endprodukte (Abb.1d und 1e) prozessiert. In das Schema der Abb.1 passen die Proteindaten von PV, FMDV, EMC und wahrscheinlich auch von HRV (Rückert a. Wimmer, 1984).

In Cardio- und Aphthoviren tritt am N-terminalen Ende des Proteinprecursors ein kurzes Leader-Peptid auf (Grubman et al., 1984; Kazachkov, 1982). Diese beiden Virusgruppen zeichnen sich zudem durch ein poly(C)-Segment in der 5'-nichttranslatierten Region des RNA-Genoms aus (Putnak a. Phillips, 1981). Außerdem besitzt FMDV vermutlich kein 2B-Produkt und 3 Genomabschnitte für Protein 3B (Grubman et al., 1984).

Die Proteine 1A bis 1D sind Strukturproteine und bilden das virale Capsid, die Proteine 2A bis 3D repräsentieren nichtstrukturelle Proteine. Ähnlich dem Rous-Sarkomvirus (von der Helm, 1977) und anderen Retroviren besitzt auch PV mindestens eine viruscodierte Protease (Protein 3C; Hanecak et al., 1982). Für die Proteine 2A und L (Leader-Peptid; s.o.) wird eine Proteasefunktion diskutiert (Toyoda, Strebel; pers. Mitteil.). Proteasen der Wirtszelle scheinen an der Prozessierung des Proteinprecursors nicht beteiligt zu sein. Protein VP0 (= Protein 1A-1B; vgl. Abb.1) wird erst am Ende des Assemblierungsvorganges in die Produkte VP4 und VP2 gespalten (Putnak a. Phillips, 1981). Ein autokatalytisches Modell für diese Spaltung wird diskutiert (Hogle et al., 1985).

Protein 3D repräsentiert die Virusreplikase (Baron a. Baltimore, 1982), Protein 3B liegt als VPg an das 5'-Ende der Genom-RNA gebunden vor und ist an der Replikation des Virus-Genoms beteiligt (Wimmer, 1982). Die Funktionen der anderen viruscodierten Proteine sind noch nicht vollständig aufgeklärt, jedoch ist Protein 2C vermutlich mit Membranen assoziiert und übt eine Funktion bei der Genomreplikation aus (Takegami et al., 1983).

2.2. Antigenstruktur des Capsids der Picornaviren

Picornaviren sind als Erreger von Poliomyelitis, Hepatitis und Schnupfen (beim Menschen) und Maul-und-Klauenseuche (bei Nutztieren) von enormer Bedeutung, sodaß die Entwicklung von Impfstoffen gegen diese Erreger eine zentrale Rolle in der Erforschung der Picornaviren spielt.

1953 entwickelte Salk eine noch heute gebräuchliche Tot-Vaccine gegen Poliomyelitis, die durch Inaktivierung von PV durch Formalin erzeugt wird (Salk, 1953). Auch die heute verwendeten FMDV-Impfstoffe werden auf ähnliche Weise produziert und verursachen vermutlich durch unvollständig abgetötetes Virusmaterial hin und wieder Infektionen (King et al., 1981).

Gegen PV konnte 1957 ein wirkungsvoller und in seiner Bedeutung bis heute nicht geschmälerter Lebend-Impfstoff entwickelt werden. Das Verfahren beruht auf den Arbeiten von Sabin und Koprowski (Sabin a. Boulger, 1973) und gründet sich auf die Beobachtung, daß PV nach mehreren Passagen in Zellkultur seine neurovirulenten Eigenschaften durch Attenuierung einbüßt, jedoch im Menschen volle Immunität gegen die virulenten Stämme zu erzeugen vermag. Heute nimmt man an, daß die extrem hohe spontane Mutationsrate von einzelsträngigen RNA-Viren (10^{-3} bis 10^{-4} im Vergleich zu der von doppelsträngiger DNA zu erwartenden Rate von 10^{-8} bis 10^{-11}) und Rekombinationsereignisse (Kew a. Nottay, 1984; King et al., 1982) bei verändertem Selektionsdruck schnell zu Mutationen führen, die für die beobachtete Attenuierung verantwortlich sein könnten (Holland et al.,

1982). Diese Form der Vaccinierung ist jedoch nicht ganz risikofrei, da in sehr seltenen Fällen Poliomyelitis vermutlich durch Rückmutation von attenuiertem PV zum neurovirulenten Phänotyp auftritt. Evans et al. (1985) konnten zeigen, daß schon eine Rückmutation an einer Nukleotidposition in der 5'-nichttranslatierten Region zu wesentlich erhöhter Virulenz von PV Typ3 (Sabin) führt und diese bei Passagierung des Virus im Menschen kontinuierlich ansteigt.

Auf Grund der erwähnten inhärenten Risiken von inaktivierten und attenuierten Impfstoffen gewinnen neu entwickelte Methoden der aktiven Immunisierung gegen Virusinfektionen immer mehr an Bedeutung: Anstelle vollständiger Viruspartikel werden immunogene Capsidbereiche in Form von isolierten Capsiduntereinheiten, als gentechnologisch hergestelltes Protein oder als chemisch synthetisiertes Oligopeptid verabreicht.

Der Einsatz von Oligopeptiden führte im PV-System nur zu geringen Erfolgen. Die getesteten Peptide erzeugen eine relativ schwache neutralisierende Immunantwort, können aber z. T. das Immunsystem prägen (aus dem Engl.: "primen"): Dabei wird dieses System durch ein Oligopeptid derart sensibilisiert, daß durch die nachfolgende Gabe einer subimmunogenen Dosis des Wildtypvirus ein guter neutralisierender Antikörpertiter resultiert (Emini et al., 1983; Jameson, 1984). Wesentlich bessere Ergebnisse lieferten FMDV-spezifische Oligopeptide, die eine Immunantwort in der Größenordnung von 1-10% der mit herkömmlicher Vaccine erreichten Antwort stimulieren und damit die Ergebnisse, die mit isoliertem FMDV-VP1 erzielt werden, um mehrere Größenordnungen übertreffen (Bittle et al., 1982).

Mehrere Arbeitsgruppen haben Capsiduntereinheiten isoliert und hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit als Vaccine untersucht. Protein VP1 des Poliovirus (Blondel et al., 1982; Chow a. Baltimore, 1982; Emini et al., 1982/83; van der Werf et al., 1982; Wychowski et al., 1983; Schild et al., 1984) und FMDV-VP1 (Laporte et al., 1973; Bachrach et al., 1975) tragen die immunogen dominanten Regionen des viralen Capsids. Das menschliche oder tierische Immunsystem reagiert aber auf die Verabreichung der VP1-Proteine bestenfalls mit sehr niedrigen Titern neutralisierender Antikörper (Dernick et al., 1983; Van der Marel et al., 1983). Ähnliches gilt für VP1 von HAV (Gehrlich a. Frösner, 1983; Hughes et al., 1984; Hughes a. Stanton, 1985). Zudem erschwert auch das langsame nichtlytische Wachstumsverhalten von HAV in Zellkulturen die Entwicklung einer Vaccine aus isoliertem VP1.

Schließlich wurde das Capsidprotein VP1 einiger Picornaviren gentechnologisch in Bakterien hergestellt: VP1 von FMDV, als Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert, stimuliert Rinder und Schweine zur Produktion neutralisierender Antikörper (Kleid et al., 1981) und kompetitiert in einem Immun-Kompetitionstest mit intaktem FMDV (Küpper et al., 1981). PV-VP1 wurde mit geringen Ausbeuten als β -Lactamase-Fusionsprotein (van der Werf et al., 1983; Wychowski et al., 1983) und als trpE-Fusionsprotein ebenfalls in *E. coli* synthetisiert (Enger-Valk et al., 1984); das trpE-Fusionsprotein aus *E. coli* war in der Lage, das Immunsystem der Ratte für die Produktion neutralisierender Antikörper zu "primen" (s.o.). Schließlich konnte FMDV-VP1 auch in *Bacillus subtilis* als Teil eines Fusionsproteins in geringen

Mengen exprimiert werden (Hardy et al., 1981).

Vor diesem Hintergrund war es das Ziel der vorliegenden Arbeit,

1. HAV-RNA revers zu transkribieren und HAV-cDNA in E. coli zu klonieren,
2. eine vollständige physikalische Karte des viralen Genoms zu erstellen,
3. HAV-VP1-cDNA in E. coli zu exprimieren, und schließlich
4. die Antigeneigenschaften der rekombinanten Expressionsprodukte zu untersuchen.

3. EXPERIMENTELLER TEIL

3.1. Material

3.1.1. Zelllinien, Bakterienstämme und Nukleinsäuren

Zelllinien:

Alexanderzellen PLC/PRF/5 (Alexander et al., 1978).

Bakterienstämme:

DH 1: F^- , recA 1, endA 1, gyrA 96, thi, hsdR 17, supE 44, relA 1, λ^- (Hanahan, 1983).

JM 109: recA 1, endA 1, gyrA 96, thi, hsdR 17, supE 44, relA 1, λ^- , delta(lac-proAB), (F', traD 36, pro AB, lacI^Qdelta M15), (Yanisch-Perron et al., 1985).

Plasmid-Vektoren:

pUC 18 (Norrander et al., 1983).

pUR 290 (Rüther a. Müller-Hill, 1983).

3.1.2. Geräte

Zentrifugen: Beckman L8-55 (Ultrazentrifuge), Sorvall RC-5B, Eppendorf 5412 (Tischzentrifuge).

Rotoren: Beckman, Sorvall.

Photometer: Shimadzu UV-120-02.

Szintillationszähler: Beckman LS 9000.

3.1.3. Enzyme und Enzyminhibitoren

Restriktionsendonukleasen (Boehringer, BioLabs, BRL)

DNase (Worthington, Boehringer)

pankreat. RNase (Sigma)

Glyoxal (EGA-Chemie)

pBR 322-Plasmide, Kalbsthymus- und Heringssperma-DNA,
sowie DNA-Molekulargewichts-Marker/ desoxyNukleotide/
Spermidin (Böhringer)

X-Gal (Biomol, Ilvesheim)

Dithiothreitol/ Dithioerythrit/ HEPES (Research Organics
Inc.)

oligo(dG)/ oligo(dT) (PL-Biochemicals)

RNasin (BRL)

Röntgenfilm X-Omat S (Kodak)

Negativfilm (Polaroid)

Verstärkerfolie Cronex Quanta III (Dupont)

Nitrozellulose BA 85/ elutip (Schleicher & Schuell)

HAVAB- und HAVAB-M-Testsatz (Abbott Laboratories, North
Chicago) für Standard-HAV-Festphasen-RIA

Alle weiteren Chemikalien wurden von der Firma Merck
bezogen.

3.2. Methoden

Wenn nicht anders vermerkt, wurden die Methoden (z.T. leicht verändert) aus Maniatis et al. (1982) übernommen.

3.2.1. Virusvermehrung und Virusisolation (Tratschin et al., 1981)

Der HAV-Stamm MBB wurde aus einem vermutlich in Marokko an Hepatitis A erkrankten Patienten isoliert und für die oligo(dT)-geprägte Klonierung 8-10 Passagen bzw. für die "primer-extension"-Experimente 13-15 Passagen in der PLC/PRF/5-Zelllinie propagiert. PLC/PRF/5-Zellen (1-2 Wochen bei 37°C in MEM-Medium mit 10% FKS gewachsen) wurden mit dem HAV-Stamm MBB mit einer Multiplizität von 0,5-1,0 infiziert. Die Zellen wurden dazu mit PBS gewaschen und anschließend mit dem in PBS verdünnten Inokulum 4h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde MEM-Medium (2,5% FKS) aufgefüllt. Nach einer 28-35 Tage dauernden Inkubation der Zellen bei 32°C in MEM-Medium (2,5% FKS) wurde der Zellrasen mit Trypsinlösung (0,25% Trypsin, 0,5 mM EDTA) abgelöst und in 6 ml/200ml-Flasche Lysispuffer (10 mM TRIS pH 7,6, 50 mM NaCl, 0,5% NP 40, 0,5% Desoxycholat und 1% Inhibin) 3mal gefroren und getaut. Nach 10-minütiger Zentrifugation (10.000 Upm, Sorvall) wurde das resultierende Pellet mit Lysispuffer reextrahiert und erneut pelletiert. Die Überstände beider Schritte wurden vereinigt und mit DNase (10 µg/ml) und MgCl₂ (5 mM) versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur

wurde die Reaktion durch EDTA (20 mM) abgestoppt und PEG (10%) sowie NaCl (0.4 M) zugefügt. Die Mischung wurde über Nacht bei 4°C gerührt und danach bei der gleichen Temperatur zentrifugiert (45', 9.000 Upm, Sorvall). Das Sediment wurde in 10 mM TRIS pH 7.6, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA suspendiert und mit Freon im Verhältnis 1:1 extrahiert. Nach 15-minütigem Rühren bei Raumtemperatur und anschließender 30-minütiger Zentrifugation (5.000 Upm, Sorvall) wurde die obere Phase abgenommen und die untere Phase reextrahiert. Die vereinigten Überstände wurden in einem SW 41-Rotor (Beckman) 4h lang bei 4°C und 38.000 Upm auf ein Sucrosekissen (30% Sucrose, 1M NaCl, 0.01 M TRIS pH 7.6) pelletiert. Das Pellet wurde anschließend in einem CsCl-Gradienten (mittlere Dichte 1.34 g/cm³, 0.02 M TRIS pH 7.6, 0.1% β -Mercaptoäthanol) einer Gleichgewichtszentrifugation unterworfen. Die Zentrifugation dauerte mindestens 44h und wurde in einem SW 51-Rotor (Beckman) bei 45.000 Upm durchgeführt. Nach Aufteilung des Gradienten in ca. 15-20 Fraktionen konnten die HAV-Antigen enthaltenden Fraktionen durch einen RIA (3.2.27.) ermittelt werden. Daneben wurde die Dichte der einzelnen Fraktionen im Refraktometer bestimmt. Die Peakfraktionen, die einer mittleren Dichte von 1,34 g/cm³ entsprachen, wurden vereinigt und erneut auf ein Sucrosekissen pelletiert.

3.2.2. Isolation von RNA

3.2.2.1. Isolation von Virus-RNA (Tratschin et al., 1981)

Das virusenthaltende Sucrosekissen wurde mit LEHA-Puffer (0.1 M LiCl, 1 mM EDTA, 25 mM HEPES pH 7.5) etwa 1:10 verdünnt, SDS (1%) und Phenol (1:1, vol/vol) zugesetzt. Die Mischung wurde geschüttelt und 3' auf 50°C erhitzt. Nach Abkühlung auf 0°C wurde ein Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (24:1) im Verhältnis 0.5:1 zugesetzt und erneut geschüttelt. Nach 5-minütiger Zentrifugation (Raumtemperatur) bei 10.000 Upm (Sorvall) wurde die wässrige Phase abgenommen und die Phenolisation ohne den Hitzeschritt wiederholt. Phenolreste in der wässrigen Phase wurden durch 2-malige Extraktion mit dem Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch entfernt. Die resultierende Lösung wurde mit Natriumazetat (0.4 M) versetzt und die RNA mit dem 2.5-fachen Volumen Äthanol bei -20°C über Nacht präzipitiert.

3.2.2.2. Isolation von zellulärer Gesamt-RNA

Die zu Standardisierungszwecken benützte CEF-RNA wurde folgendermaßen gewonnen: Die Zellen wurden in 10 mM TRIS pH 7.6/50 mM NaCl gewaschen, anschließend mit Lysispuffer (10 mM TRIS pH 7.6/ 5 mM EDTA/ 50 mM NaCl/ 0.5% NP-40/ 0.5% DOC/ 1% Inhibin) versetzt und mit einem Gummischaber abgelöst. Nach sanftem Mischen und 5-minütiger Inkubation in Eis wurde das Gemisch 10' in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert. Die Nukleinsäure

im Überstand wurde nach 2-maliger Extraktion mit Phenol/Chloroform Äthanolpräzipitiert.

3.2.3. Reverse Transkription von HAV-RNA

3.2.3.1. "Primer": oligo(dT)

0.1-1.0 μ g Äthanolpräzipitierte RNA wurden 2-mal mit Äthanol umgefällt und mit 70%igem Äthanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 10 μ l Wasser gelöst und 2' auf 55°C erhitzt. Danach wurde die reverse Transkription in folgendem Ansatz für die Dauer von 40' bei 42,5°C in einem Volumen von 100 μ l durchgeführt: 80 mM TRIS pH 8.3; 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0.8 mM DTT, je 0.4 mM dATP/dTTP/dGTP/ α -³²P-dCTP (1.25 Ci/mmol), 16 μ g/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈, 2.000 U/ml RNasin, R.T. 120 U/ml. Die Reaktion wurde durch Zusatz von EDTA (20 mM) abgestoppt.

3.2.3.2. "Primer": Zufalls-"Primer"

3.2.3.2.1. Herstellung des Zufalls-"Primers"

1g Kalbsthymus-DNA wurde in 30 ml 20 mM TRIS pH 7.4 und 10 mM MgCl₂ gelöst. Nach 30-minütiger Inkubation mit 2g pankreatischer DNase bei 37°C wurden 3 ml einer 10%igen SDS-Lösung und 1.5 ml Pronase (20 mg/ml) zugesetzt und weitere 45' bei 37°C inkubiert. Nach 2-maliger Extraktion mit Phenol/Chloroform wurde die DNA in der wässrigen Phase durch 15-minütiges Kochen und anschließendes Abkühlen auf Eis denaturiert. Anschließend wurde NaCl (0.1 M) zugegeben und die Lösung über eine DEAE-Zellulose-Säule (20 ml), die mit 5 mM TRIS pH 7.4, 1 mM EDTA

und 0.1 M NaCl äquilibriert ist, geschickt. Mit dem gleichen Puffer wurde nun die Säule mehrmals gewaschen (ca. 300 ml) und die DNA-Fragmente (der "Primer") mit einer Lösung von 5 mM TRIS pH 7.4, 1 mM EDTA und 0.3 M NaCl (ca. 150 ml) eluiert. Nach Äthanolpräzipitation des "Primers" wurde die DNA in H₂O gelöst und die Konzentration auf ca. 50 mg/ml eingestellt.

Da das haploide Säugergenom eine Komplexität von etwa 1.5×10^9 B besitzt, beträgt die Länge einer Sequenz, die mit der Wahrscheinlichkeit 1 darin repräsentiert ist, ca. 13 B. Kürzere Sequenzen sind mit entsprechend höherer Wahrscheinlichkeit darin enthalten. Da wegen der hohen Komplexität des "random-primer" eine bestimmte Sequenz nur sehr selten vorkommt, wurde die Reaktion mit einem hohen Überschuß (40 µg: 0.1 µg) an Primer gestartet: der 400 fache Gewichtsüberschuß muß noch mit dem Verhältnis der Molekülgrößen (ca. 400, wenn man eine mittlere "Primer"-Länge von 20 B annimmt) multipliziert werden, um das ausschlaggebende molare Verhältnis von RNA:"Primer" zu erhalten. Auf ein RNA-Molekül kommen also im Reaktionsansatz über 10^5 "Primer"-Moleküle, sodaß eine zuverlässige Initiation der reversen Transkription gewährleistet ist.

Um zu testen, inwieweit der "random-primer" die Synthese spezifisch an exogener RNA initiiert, wurde folgendes Kontrollexperiment ausgeführt: Unter identischen Bedingungen wurde die cDNA-Synthese mit bzw. ohne HAV-RNA (in diesem Fall keine Erhitzung auf 55°C vor Reaktionsstart) durchgeführt (vgl. 3.2.3.2.2.):

	0'	40'	
<u>ohne RNA</u>	400	496	(TCA-fällbare cpm)
<u>mit RNA</u>	2260	8838	(")

Das Ergebnis zeigt, daß die Synthese vom Zusatz exogener RNA abhängt.

3.2.3.2.2. cDNA-Synthese mit Hilfe des Zufalls-"Primers"

In einigen Synthesen wurde anstelle von oligo(dT) ein Zufalls-"Primer" (400 µg/ml), der vor Zusatz 3' auf 100°C erhitzt und in Eis abgekühlt wurde, eingesetzt. Die übrigen Reaktionsbedingungen waren wie in 3.2.3.3.

3.2.3.3. Herstellung von Hybridisierungsproben mit R.T.

Wurde die cDNA für Hybridisierungsexperimente verwendet, so betrug die Konzentration von (α -³²P)-dCTP 0.1 mM (10 Ci/mmol) in einem Reaktionsvolumen von 50 µl (alle anderen Parameter wie in 3.2.3.1.). Die ss-cDNA wurde nach Verdau der RNA durch Alkali (vgl. 3.2.4.) in einem alkalischen Gel (vgl. 3.2.17.2.) aufgetrennt, eluiert (vgl. 3.2.16.4.) und ohne Reinigung über eine "Elutip"-Säule weiterverwendet.

Nur ein Teil der cDNA wurde eluiert: Moleküle, die kürzer als 1.000 B (Zufalls-"Primer") bzw. kürzer als 2.000 B (oligo-dT als "Primer") waren, wurden verworfen. In einem Experiment wurde die Fraktion der dT-cDNA

verwendet, die die cDNA-Moleküle mit Längen von 500 bis 2.000 B umfaßt.

3.2.3.4. "Primer": Restriktionsenzym-Fragmente (nach Casey a. Davidson, 1977)

Zwei cDNA-Synthesen wurden in Gegenwart eines Restriktionsfragmentes anstelle von oligo(dT) durchgeführt. 2 µg Fragment wurden zusammen mit etwa 0.5 µg Virus-RNA 2' bei 100°C in 10 µl H₂O denaturiert, schnell auf -60°C abgekühlt und in 80% Formamid (vol/vol), 0.4 M NaCl, 0.01 M PIPES-HCl pH 6.4 und 2 mM EDTA 2h bei 42°C in 100 µl hybridisiert. Die Hybride wurden auf 200 µl verdünnt und Äthanolpräzipitiert. Der letzte Schritt wurde 3mal wiederholt. Die anschließende Synthese wurde wie in 3.2.3.1. durchgeführt, ohne jedoch die Hybride vor Reaktionsstart zu erhitzen und ohne Einsatz von oligo(dT); das Gemisch wurde außerdem nach 20' 1 Minute auf 60°C erhitzt, in Eis abgekühlt und die Reaktion nach Zusatz von weiteren 120 U/ml R.T. fortgesetzt.

3.2.4. Alkaliverdau der viralen RNA

Die in 3.2.3.1. - 3.2.3.4. erhaltenen RNA-DNA-Hybride wurden in Gegenwart von NaOH (0.4M), NaCl (0.8M) und EDTA (40 mM) 1h auf 45°C erhitzt und dadurch von RNA befreit. Anschließend wurde Essigsäure und Natriumacetat bis zu neutralem pH zugesetzt und das Gemisch über eine Sephacrylsäule gereinigt.

3.2.5. ds-cDNA-Synthese mit Klenow-Polymerase

Die erste Peakfraktion der Sephacrylsäule nach Alkali-verdau der RNA (durch Cerenkovzählung bestimmt; vgl. 3.2.4.) wurde nach Äthanolpräzipitation unter folgenden Bedingungen der Zweitstrangsynthese unterworfen: TRIS pH 7.6 10 mM, $MgCl_2$ 5 mM, DET 5 mM, dATP/dTTP/dGTP/ $(\alpha\text{-}^{32}P)$ dCTP (5 Ci/mmol) 50 μ M, 10-300 ng cDNA, Klenow-Polymerase (30 U/ml). In einem Fall enthielt das Gemisch außerdem 50 μ g/ml BSA. Die Inkubation bei 37°C dauerte 30' und wurde in einem Volumen von 50 μ l durchgeführt. Die Reaktion wurde mit EDTA (20 mM) abgestoppt und die doppelsträngige cDNA über eine Sephacrylsäule gereinigt und Äthanolpräzipitiert.

3.2.6. S1-Nukleaseverdau der ds-cDNA

Ein kleiner Teil der ds-cDNA wurde zur Ermittlung einer optimalen Nukleasekonzentration mit unterschiedlichen Mengen Enzym inkubiert (vgl. 4.1.4.1.2.). Auf Grund dieser Pilotexperimente wurden alle S1-Nukleasespaltungen in 0.2 M NaCl/50 mM Natriumacetat pH 4.5/1mM $ZnSO_4$ /0.5% Glycerin in Gegenwart von 5-10 U S1-Nuklease/ng cDNA bei 37°C durchgeführt. Die Inkubation dauerte 1h und wurde in einem Volumen von 200 μ l durchgeführt. Die Reaktion wurde durch Zusatz von EDTA (20 mM) beendet und die Nukleinsäure nach 2-maliger Extraktion mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) mit dem 2.5-fachen Volumen Äthanol präzipitiert.

3.2.7. Synthese von Homopoly(dC)-Enden (Deng a. Wu, 1981)

In einem Pilotexperiment mit 2 μ g pBR 322-DNA (mit Pst I verdaut) wurden die Reaktionsbedingungen ermittelt, die zur Addition von ca. 30 dG-Resten/3'-Ende in 30' führten. Da die TdT eine höhere Affinität zu dCTP als zu dGTP besitzt, wurde zur Addition von dC-Resten an ds-cDNA die Inkubationsdauer auf 25' verkürzt.

3.2.7.1. Homopoly(dC)-Synthese zur Klonierung von cDNA

10-200 ng ds-cDNA wurden in 0.14 M Kaliumcacodylat, pH 7.2, 1 mM CoCl_2 , 0.2 mM DET, 100 μ g/ml BSA, 50 μ M (α - ^{32}P)dCTP (12 Ci/mmol), 1 μ M dTTP und 700 U/ml TdT in einem Volumen von 50 μ l 25' bei 30°C inkubiert. In einem Fall diente der Homopoly(dC)-Strang zur Bindung des "Primers" für die Zweitstrangsynthese (vgl. 3.2.8.): Um eine relativ kurze (dC)-Sequenz zu erhalten, wurde die Reaktionszeit auf 13' verkürzt und die Enzymkonzentration auf 400 U/ml erniedrigt. Außerdem wurde nichtmarkiertes dCTP und kein dTTP eingesetzt.

3.2.7.2. Endmarkierung von DNA durch TdT

In einigen Experimenten wurde die terminale Transferase zur radioaktiven Endmarkierung von cDNA-Fragmenten eingesetzt. Um zu gewährleisten, daß nicht mehr als 1 Nukleotid an ein 3'-Ende der DNA geheftet wird, wurde (α - ^{32}P)dCTP in einer Konzentration von 0.2 μ M (ca. 3000 Ci/mmol) eingesetzt und dTTP weggelassen (Die übrigen Reaktionsbedingungen wie in 3.2.7.1.). Da die Reaktion

unter den gegebenen Bedingungen von der dCTP-Konzentration abhängt, sollte höchstens 1 Nukleotid an ein 3'-Ende geheftet werden.

Eine poly(dT)-Hybridisierungsprobe wurde wie in 3.2.7.1., jedoch mit folgenden Abwandlungen synthetisiert: cDNA wurde durch oligo(dT)₁₂₋₁₈ (10 µg) ersetzt, die dTTP-Konzentration auf 25 mM erhöht und (α -³²P)dCTP in einer Konzentration von 0.2 µM (ca. 3000 Ci/mmol) eingesetzt.

3.2.8. ds-cDNA-Synthese mit R.T.

In einem Experiment wurde die in 3.2.3.4. erhaltene ss-cDNA wie in 3.2.7.1. mit einem (dC)-Homopolymer versehen und der Zweitstrang wie in 3.2.3.1. mit folgenden Abwandlungen synthetisiert: Anstelle von RNA wurden ca. 50 ng cDNA eingesetzt, die Nukleotidkonzentrationen waren 0.4 mM dATP/dTTP/dCTP, 0.1 mM (³H)dGTP (4 Ci/mmol). Als "Primer" diente anstelle von oligo(dT) 20 µg/ml oligo(dG)₁₂₋₁₈. Nach säulenchromatographischer Reinigung (Sephacrylsäule) und Äthanolpräzipitation wurde wie in 3.2.7.1. verfahren.

3.2.9. Einbau der ds-cDNA in den Vektor pBR 322

10-100 ng ds-cDNA wurden in einem Volumen von 50 µl in 0.1 M NaCl, 0.01 M TRIS pH 7.8, 0.1 mM EDTA zusammen mit 40 ng pBR 322 (PST-gespalten, 25-30 dG-Reste/3'-Ende) 5' auf 65°C erhitzt und anschließend bei 57°C 1.5h hybridisiert. Nach Abkühlung in Eis wurden die Hybride Äthanolgefällt, pelletiert und in 10 µl H₂O gelöst.

3.2.10. Säulenchromatographie

3.2.10.1. Sephacrylsäule

Nach Alkaliverdau (3.2.4.), Zweitsträngsynthese (3.2.5./3.2.8.) und Endmarkierung (3.2.7.2.) wurden nichtinkorporierte radioaktiv markierte Nukleotide über eine Sephacrylsäule (S-200) abgetrennt (Säulenvolumen: 5 ml, Säulenpuffer: 10 mM TRIS pH 8.0/ 5 mM EDTA).

3.2.10.2. Ultrogelsäule

Nach Anfügen von Homopolymersequenzen an zu klonierende cDNA (3.2.7.1.) wurde über eine Ultrogelsäule (A-4) eine Größenselektion der Syntheseprodukte vorgenommen. Das Säulenvolumen betrug 7 ml, die Säule war mit 10 mM TRIS pH 8.0/ 50 mM NaCl/ 5 mM EDTA äquilibriert. Das Eluat wurde in 200 μ l-Fractionen gesammelt, die ersten 3-5 Radioaktivität enthaltenden Fractionen äthanol-präzipitiert und wie in 3.2.9. weiterbehandelt.

3.2.11. Messung der Konzentration radioaktiv markierter Nukleinsäuren

3.2.11.1. Messung von (α -³²P)dCTP

1-2% eines Reaktionsgemisches wurden vor und nach Inkubation entnommen und mit je 100 μ l Heringssperma-DNA (4 mg/ml) und 4 ml 10%iger TCA-Lösung gemischt. Nach 15-minütiger Inkubation in Eis wurden die Proben durch

Glasfaserfilter gesaugt, 3 mal mit dem gleichen Volumen 10%iger TCA gewaschen und abschließend 1 mal mit dem gleichen Volumen 95%igem Äthanol gespült. Die getrockneten Filter wurden mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und die Aktivität in einem Flüssigkeits-szintillationszähler bestimmt.

3.2.11.2. Messung von (^3H)dGTP

1-2% des Reaktionsansatzes wurden vor bzw. nach der Inkubation auf Whatman DE-81 Filter getropft und nach 6-maligem Waschen in 0.5 M Na_2HPO_4 (je 5') 2 mal kurz in H_2O und zweimal kurz mit 95%-igem Alkohol gespült. Nach Trocknung und Zusatz von Szintillationsflüssigkeit wurde die filtergebundene Aktivität in einem Szintillationszähler gemessen und die Syntheseleistung kalkuliert.

3.2.12. Messung der Konzentration unmarkierter Nukleinsäuren

3.2.12.1. Spektrophotometrie

Relativ saubere Nukleinsäurepräparationen wurden im Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, wobei davon ausgegangen wurde, daß ein OD-Wert von 1 etwa 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ds-DNA, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ss-DNA bzw. RNA oder 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Oligonukleotiden entspricht. Der Abschätzung des Reinheitsgrades der Nukleinsäuren lag die Annahme zugrunde, daß reine DNA ein $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Verhältnis von 1.8, RNA hingegen eines von 2.0 besitzt.

3.2.12.2. Optische Schätzung der Konzentration Ethidiumbromid-gefärbter ds-DNA

Niedrige DNA-Konzentrationen (<250 ng/ml) und die Konzentration einer mit UV-absorbierenden Substanzen verunreinigten Nukleinsäure wurden geschätzt, indem ein Aliquot neben Standards mit bekannten Mengen einer Nukleinsäure auf ein kleines, Ethidiumbromid enthaltendes Agarosegel getropft wurde.

3.2.13. Transformation von *E. coli*-Zellen

Verschiedene *E. coli*-Stämme wurden nach der von Hanahan (1983) beschriebenen Methode mit diversen Antibiotikaresistenz vermittelnden Plasmiden transfiziert.

Der gewünschte *E. coli*-Stamm wurde in 100 ml SOB-Medium (2% Bactotrypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 2.5 mM KCl) in Gegenwart des erforderlichen Antibiotikums (50 μ g/ml Ampicillin bzw. 12.5 μ g/ml Tetracyclin) bis zu einer $OD_{550\text{ nm}}$ von 0.45-0.55 geschüttelt. Nach Abkühlung auf Eis (10') wurden die Zellen zentrifugiert (10', 4°C, 3.500 Upm, Sorvall) und in 30 ml TFB-Puffer (10 mM K-MES pH 6.2, 100 mM RuCl₃, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 0.3 mM Hexamin-CoCl₃) suspendiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis (10-15') wurden die Zellen wieder zentrifugiert (10', 4°C, 3.500 Upm, Sorvall) und in 8 ml TFB-Puffer suspendiert. Anschließend wurde frisches DMSO zugesetzt (3.5%) und erneut 5' auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von DTT (75 mM) und weiteren 10' in Eis wurde nochmals die gleiche Menge DMSO (3.5%) zugegeben und wieder 5' inkubiert. 200 μ l-Aliquots dieser Mischung wurden mit bis zu 10 μ l

Plasmidlösung gemischt und weitere 30' auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen hitzebehandelt (90'' bei 42°C, ohne Schütteln) und nach 2-minütiger Abkühlung in Eis mit 800 µl SOC-Medium (=SOB-Medium mit 20 mM Glukose) 1h bei 37°C ohne Schütteln reaktiviert. 100µl-Aliquots wurden auf je 1 LM-Schale (enthalten 1% Bactotrypton, 0.5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 1% Bactoagar) in Gegenwart des gewünschten Antibiotikums (s.o.) platiert. Nach Bebrüten der Schalen (37°C, 24-48 h) wurden die Klone auf eine frische LM-Platte geimpft und erneut bei 37°C über Nacht inkubiert. Waren die kompetenten Zellen nicht zur sofortigen Transfektion bestimmt, so wurden die Zellen anstelle von TFB- in FSB-Puffer (10 mM Kaliumacetat pH 6,2, 100 mM RuCl₃, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM Hexamin-CoCl₃, 10% Glyzerin) sensibilisiert und nach DMSO-Behandlung (jedoch kein DTT-Zusatz) in 200µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Sollten diese Zellen transfiziert werden, wurden sie vor Zusatz von 10 µl Plasmidlösung 15' in Eis aufgetaut und anschließend wie oben behandelt.

3.2.14. Bakterienkultur und -lagerung

Nicht zur Transformation bestimmte Bakterien wurden in LB-Medium (1% Bactotrypton, 0.5% Hefeextrakt, 1% NaCl) oder auf LB-Platten (enthalten zusätzlich 1% Bactoagar) gezüchtet, auf denen auch die Lagerung erfolgte (alle 2-3 Wochen Überimpfung auf frische Platten). Transformierte Stämme wuchsen in Gegenwart von Ampicillin (50 µg/ml) oder Tetracyclin (12.5 µg/ml). Zur Langzeitlagerung wurden die Zellen in Freezing-Medium (6.3g K₂HPO₄, 0.45g Na⁺-Citrat, 0.09g MgSO₄·7H₂O, 0.9g

($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.8g KH_2PO_4 und 44g Glyzerin pro Liter) suspendiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt (Schleif a. Wensink, 1981; S.201 f).

3.2.15. Präparation von Plasmiden

3.2.15.1. Aufarbeitung von 1.5 ml-Kulturen

1.5 ml stationäre Bakterienkultur wurden zentrifugiert (4°C), das Pellet in 100 μl 50 mM Glukose/ 10 mM EDTA/ 25 mM TRIS pH 8.0/ Lysozym (4 mg/ml) 5' lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend nach Zusatz von 200 μl 0.2 M NaOH/1% SDS sanft gemischt und 5' auf Eis gestellt. Danach wurde das Gemisch mit 150 μl 3 M K^+ /5 M Acetat (pH 4.8) neutralisiert, geschüttelt und 5' in einer Eppendorffzentrifuge pelletiert. Der Überstand wurde mit einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) extrahiert, mit dem doppelten Volumen Äthanol versetzt und nach 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur zentrifugiert (5'). Das Pellet wurde mit 70%igem Äthanol gewaschen und getrocknet. In die anschließende Restriktion war 20 $\mu\text{g/ml}$ pankreatische RNase eingeschlossen.

3.2.15.2. Aufarbeitung von 500 ml-Kulturen

Das Bakterienpellet einer Übernachtskultur wurde in 10 ml 50 mM Glukose/25 mM TRIS pH 8.0/ 10 mM EDTA/Lysozym (5mg/ml) für die Dauer von 5' bei Raumtemperatur inkubiert, mit 20 ml 0.2 M NaOH/1% SDS gemischt und 10' auf Eis gestellt. Dieses Gemisch wurde nun mit 15 ml 3 M

K⁺/5 M Acetat versetzt und erneut auf Eis gestellt (10'). Nach der anschließenden Zentrifugation (20', 20.000 Upm, Sorvall, 4°C) wurde der Überstand mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit 0.6 Volumina Isopropanol versetzt und nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 30' bei 20.000 Upm (Sorvall) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70%igem Äthylalkohol gewaschen, getrocknet und in 10 mM TRIS pH 8.0/2 mM EDTA/RNase (20 µg/ml) gelöst und zur Befreiung von RNA 4-12h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA über eine "Elutip"-Säule (vgl. 3.2.16.1.) gereinigt.

3.2.16. Methoden der Reinigung und Verarbeitung von DNA

3.2.16.1. "Elutip"-Säule

Nichtmarkierte Nukleinsäuren wurden in 10 mM TRIS pH 7.6/5 mM EDTA/0.2 M NaCl durch die Säule gedrückt und nach Waschen der Säule (mit ca. 4 ml des gleichen Puffers) mit 0.4 ml 10 mM TRIS pH 7.6/5 mM EDTA/1.0 M NaCl eluiert und mit dem 2.5fachen Volumen Äthanol gefällt.

Radioaktiv markierte DNA wurde in 0.4 ml 10 mM TRIS pH 7.6/5 mM EDTA/0.4 M NaCl durch die Säule gedrückt und nach Waschen der Säule mit dem gleichen Volumen des gleichen Puffers mit 0.4 ml 10 mM TRIS pH 7.6/5 mM EDTA/1.0 M NaCl eluiert und Äthanolpräzipitiert.

3.2.16.2. Proteinase K-Behandlung

Nukleinsäuren, die für Ligationsexperimente vorgesehen waren, wurden wie in 3.2.15. präpariert, jedoch wurde

die RNA in 20 mM TRIS pH 7.6/5 mM EDTA/5 mM EGTA/RNase (20 µg/ml) über Nacht bei 37°C abgebaut und danach Proteine durch Zusatz von 100 µg/ml Proteinase K (vorverdaut 2h/37°C) und 0.5% SDS hydrolysiert (30', 50°C). Diese Lösung wurde nun 2mal mit Phenol-Chloroform extrahiert und mit Alkohol gefällt.

3.2.16.3. Restriktionsenzymverdau von DNA

0.1 (analytisch) bis 20 (präparativ) µg DNA wurden in 40 (analytisch) bis 500 (präparativ) µl Restriktionsenzympuffer (wie vom Hersteller des Enzyms empfohlen) in Gegenwart der gewünschten Restriktionsendonuklease (0.5-30 µg DNA) bei 37°C gespalten (1-15h). Sollte die zu spaltende DNA nur partial verdaut werden, wurden 10-50 ng endmarkierte DNA (ca. 10⁴ cpm; vgl. 3.2.7.2.) in Gegenwart von 0.1 U Enzym 5'-30' inkubiert.

3.2.16.4. Elution von DNA aus Agarosegelen

Restriktionsenzym-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, im UV-Licht als ethidiumbromidgefärbte Banden sichtbar gemacht und folgendermaßen isoliert: Mit einem Skalpell wurden Gelblöcke, die je 1 Bande enthielten, ausgeschnitten und in einem Dialyseschlauch in Gegenwart von 300-500 µl 1x Elpho-Puffer (vgl. 3.2.17.1.) 1-2 h in einer Gelkammer unter Standardbedingungen elektrophoretisiert. Anschließend wurde der DNA-enthaltende Puffer entnommen und über eine "Elutip"-Säule (3.2.16.1.) gereinigt.

3.2.16.5. "Nick-translation" von DNA (Rigby et al., 1977)

Über "Elutip" gereinigte DNA wurde in folgendem Ansatz 70' bei 15°C inkubiert: 0.1-1.0 µg DNA, 0.05 M TRIS pH 7.2, 0.01 M MgSO₄, 0.1 mM DTT, 50 µg/ml BSA, 20 µM dATP/dTTP/dGTP, 0.2 µM (α-³²P)dCTP (ca. 3.000 Ci/mmol), DNase I (50 ng/ml), DNA-Polymerase I (40 U/ml), das Volumen betrug 50 µl. Die Reaktion wurde mit EDTA (20 mM) abgestoppt und nichtinkorporierte Nukleotide über eine "Elutip"-Säule (3.2.16.1.) abgetrennt. Das Eluat wurde ohne weitere Behandlung zur Hybridisierung verwendet.

3.2.17. Gele zur Auftrennung von Nukleinsäuren

3.2.17.1. Gele mit neutralem Puffer zur Auftrennung von Restriktionsenzym-Fragmenten

Restringierte DNA (0.1-10 µg) wurde auf 0.7-1.5%igen Agaroseflachgelen (Breite=12 cm/ Länge=15 cm/ Dicke=0.6 cm) in 1x Elpho-Puffer (0.045 M TRIS-Borat, 0.045 M Borsäure, 0.001 M EDTA, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, pH 8.2) bei einer Stromstärke von 5-7 V/cm 4-5 h elektrophoretisiert. Die in Restriktionsenzym-puffer befindlichen DNA-Proben wurden vor dem Laden mit 0.25 Volumina Ladepuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylen-cyanol, 15% Ficoll Typ 400 in H₂O) gemischt und 5' auf 60°C erhitzt.

3.2.17.2. Gele mit alkalischem Laufpuffer

Einzelsträngige DNA (10^3 - 10^4 cpm) wurde in alkalischen, vertikalen Gelen (Breite= 12 cm, Länge= 13 cm, Dicke= 1.5 mm), die zwischen 2 Glasplatten eingespannt waren, in 30 mM NaOH/1 mM EDTA bei einer Stromstärke von 7 V/cm aufgetrennt. Da heiße NaOH Agarose zerstört, wurden die Agarosegele (1.0%) zunächst in 50 mM NaCl/ 1 mM EDTA hergestellt und vor dem eigentlichen Gellauf 2 h in 30 mM NaOH/ 1 mM EDTA präelektrophoretisiert. Die DNA-Probe wurde Äthanolpräzipitiert und das Pellet in 20 µl alkalischem Ladebuffer (50 mM NaOH, 1 mM EDTA, 2.5% Ficoll Typ 400, 0.025% Bromkresolgrün) gelöst. Nach Beendigung des Laufes (Dauer 4-5 h) wurde das Gel in 1x Elphopuffer (3.2.17.1.) neutralisiert (30') und anschließend bei -20°C autoradiographiert oder Gelblöcke ausgeschnitten und die DNA eluiert. Der DNA-Molekulargewichts-Marker wurde nach Beendigung der Autoradiographie durch Übereinanderlegen von Gel und Röntgenfilm auf den Film übertragen.

3.2.17.3. Gele zur Auftrennung glyoxal-denaturierter RNA (Thomas, 1980)

RNA (0.1-1.0 µg) wurde vor Gelauf-trennung Äthanolpräzipitiert und in 10 µl 1 M Glyoxal/ 50% (vol/vol) DMSO/ 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7.0) bei 50°C 1h denaturiert. Die Proben wurden auf Eis abgekühlt und nach Zusatz von Ladebuffer (3.2.17.1.) auf vertikalen Agarosegelen (12 cm breit, 13 cm lang, 1.5 mm dick,

1.5% Agarose), die zwischen 2 Glasplatten eingespannt waren, in 10 mM Phosphatpuffer pH 7.0 bei einer Stromstärke von 5 V/cm aufgetrennt. Nach Beendigung des Laufes wurde die RNA entweder angefärbt (in 0.5 µg/ml Ethidiumbromidlösung) oder ohne weitere Behandlung auf Nitrozellulose ge-"blottet" (vgl. 3.2.18.2.).

3.2.17.4. PAGE für DNA

Restringierte DNA, die wie in 3.2.17.1. mit Ladepuffer versetzt war, wurde auf vertikalen Polyacrylamidgelen (12 cm breit, 13 cm lang, 1.5 mm dick), die 8 oder 12% Acrylamid, 0.3% N,N'-Methylenbisacrylamid und 0.03% TEMED enthielten und in Gegenwart von 0.06% APS polymerisierten, in TBE-Puffer (0.089 M TRIS-Borat, 0.089 M Borsäure, 0.002 M EDTA, pH 8.3) aufgetrennt. Die Stromstärke betrug über 4-5h 7 V/cm. Danach wurden die Gele in 0.5 µg/ml Ethidiumbromidlösung gefärbt (15') und fotografiert.

3.2.17.5. DNA- und RNA-Molekulargewichts-Marker

Parallel zu DNA-Proben wurden zur Molekulargewichtsbestimmung 0.5-1.0 µg eines Hind III/Eco RI-Verdau (21.23, 5.15, 4.97, 4.27, 3.53, 2.03, 1.90, 1.58, 1.33, 0.98, 0.83 und 0.56 Kbp) oder eines Hind III-Verdau (23.13, 9.42, 6.56, 4.36, 2.32, 2.03 und 0.56 Kbp) des Phagen λ und eines Hpa II-Verdau des Plasmids pBR 322 (622, 527, 404, 309, 242, 238, 217, 201, 190, 180, 2x160, 2x147, 122, 110, 90, 76 und 67 b) verwendet.

Zur Bestimmung der Molekulargewichte von RNA-Proben wurde parallel zur Nukleinsäure ribosomale CEF-RNA aufgetrennt.

3.2.18. Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulosefilter

3.2.18.1. "Southern"-Blot (Southern, 1975)

Fotographierte, DNA-enhaltende Agarosegele (vgl. 3.2.17.1.) wurden 2x 30' in 0.5 M NaOH/ 1.5 M NaCl geschüttelt und anschließend 2x 30' in 0.5 M TRIS pH 7.0/3.0 M NaCl neutralisiert. Danach wurde die denaturierte DNA mittels 10x SSC (1.5 M NaCl, 0.15 M Natriumcitrat pH 7.0) an einen mit 2x SSC vorbehandelten Nitrozellulosefilter gesaugt (Dauer: 24h). Die Filter wurden dann vom Gel abgezogen, 5' in 6x SSC gespült, luftgetrocknet und 2h bei 80°C gebacken.

3.2.18.2. "Northern"-Transfer (Thomas, 1980)

RNA, die mit Glyoxal denaturiert war (vgl. 3.2.17.3.) wurde nach Beendigung des Gellaufes ohne weitere Behandlung des Geles mit 20x SSC an Nitrozellulosefilter, die kurz in H₂O getaucht und mit 20x SSC äquilibriert waren, gesaugt (Dauer: 24h). Die Filter wurden dann abgezogen und nach Lufttrocknung ohne weitere Behandlung 2h bei 80°C gebacken.

3.2.18.3. Nitrozellulosebindung von DNA durch Auftropfen

Sollte gereinigte DNA direkt und ohne Gelseparation an Filter gebunden werden, so wurde sie mit Athanol gefällt, in 10 μ l H₂O gelöst und 10' gekocht. Nach Abkühlung auf Eis wurden 10 μ l 20x SSC zugesetzt und die denaturierte DNA mittels eines untergelegten Saugpapiers in 5 μ l-Portionen an die mit 6x SSC vorbehandelte Nitrozellulose gesaugt ("dot-blot"). Der Filter wurde schließlich in 6x SSC gewaschen (5'), luftgetrocknet und 2h bei 80°C gebacken.

3.2.18.4. Koloniehybridisierung (Grunstein a. Hogness, 1975)

Agarplatten, die das erforderliche Antibiotikum enthielten (vgl. 3.2.14.), wurden luftblasenfrei mit Nitrozellulose belegt und die zu testenden Klone mittels eines Aluminiumstempels von der Mutterplatte auf die Nitrozellulose getupft. Nach 8-stündiger Bebrütung bei 37°C wurden die Filter abgezogen und auf frische Agarplatten, die neben Ampicillin bzw. Tetracyclin noch 200 μ g/ml Chloramphenicol enthielten, übertragen und weitere 12 h bebrütet. Die Stempelgröße war so gewählt, daß in einem Arbeitsgang (= 1 Agarplatte) 52 Klone untersucht wurden. Die DNA wurde nun an die Filter gebunden, indem diese 7' an der Unterseite mit 0.5 M NaOH, 2' mit 1 M TRIS pH 7.4 und schließlich 4' mit 0.5 M TRIS pH 7.4/ 1.5 M NaCl benetzt wurden. Die Nitrozellulose wurde nun mit 0.5 M TRIS pH 7.4/ 1.5 M NaCl gespült und 2h luftgetrocknet. Schließlich wurden fett-

lösliche Substanzen durch 10-minütiges Schwenken in Chloroform entfernt, die Filter getrocknet und 2 h bei 80°C gebacken.

3.2.19. Hybridisierung filtergebundener Nukleinsäuren (Thomas, 1980)

3.2.19.1. Hybridisierung mit radioaktiv markierter cDNA

Filtergebundene DNA und RNA wurden wie folgt gegen radioaktiv markierte DNA hybridisiert: Die Nitrozellulosepapiere wurden in 50% (vol/vol) deionisiertem Formamid/ 5x SSC/ 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 6.8/ ultraschallbehandelte, denaturierte Heringssperma-DNA (250 µg/ml)/ 0.02% BSA/ 0.02% Ficoll/ 0.02% Polyvinylpyrrolidon präinkubiert (8-20 h bei 42°C). Pro cm² Filter wurden 0.1-0.2 ml des Puffers benötigt. Die markierten DNA-Proben (10⁵-10⁷ cpm) wurden in 20-300 µl H₂O, 1x Elphopuffer oder Säulenpuffer (vgl. 3.2.10.1./3.2.16.1.) 5-10' gekocht, in Eis abgekühlt und dem Präinkubationsmix zugegeben. Nach 20-stündiger Hybridisierung bei 42°C wurden die Filter 4x in 2x SSC/ 0.1%SDS bei Raumtemperatur (je 5') und 2x in 0.1x SSC/ 0.1% SDS bei 55°C (je 15') gewaschen, in Plastikbeutel eingeschweißt und autoradiographiert.

3.2.19.2. Hybridisierung mit radioaktiv markiertem poly(dT)

In einem Experiment wurde oligo(dT) als Hybridisierungsprobe benutzt, sodaß folgende Änderungen des Protokolls (3.2.19.1.) erforderlich waren: Die Tempera-

tur der Vorhybridisierung und der Hybridisierung betrug 32°C und alle Waschschrirte wurden bei Raumtemperatur durchgeföhrt.

3.2.20. Fotografie und Autoradiographie

Gele, die mit Ethidiumbromid angefärbt waren, wurden auf einer UV-Leuchtbody mit Polaroid-Filmen fotografiert.

Nitrozellulosefilter oder Agarosegele wurden feucht (in Plastikfolie eingeschweißt) mit einem Kodak-X-Omat-Film bedeckt und mit einer Verstärkerfolie bei -80°C exponiert (1h-7 Tage).

3.2.21. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation wurden nur Proteinase K-behandelte DNA-Präparationen (vgl. 3.2.16.2.) verwendet, die nach Gelelution durch 5-maliges Ausschütteln mit iso-Amylalkohol (gleiches Volumen) von Ethidiumbromid befreit und anschließend nach 1-maliger Extraktion mit dem gleichen Volumen Chloroform über eine "Elutip"-Säule gereinigt wurden. Die Reaktion erfolgte in 50 mM TRIS pH 7.4/ 10 mM MgCl₂/ 10 mM DTT/ 1 mM Spermidin/ 0.6 mM dATP/ 100 µg/ml BSA/ 10-100 ng DNA/ T4-DNA-Ligase (50 U/ml). Das Volumen betrug 20 µl und die Inkubation erfolgte 16 h bei Raumtemperatur. 10 µl des Ansatzes wurden ohne weitere Bearbeitung mit kompetenten Zellen gemischt und transfiziert (3.2.13.).

3.2.22. Synthese von β -Galaktosidase-Fusionsproteinen in *E. coli* (Messing et al., 1977)

3.2.22.1. Induktion auf Agarplatten

Um nachzuprüfen, ob eine Insertion in Vektor pUC 18 im passenden Leseraster vorliegt, wurden die entsprechenden JM 109-Klone auf LB-Platten, die zusätzlich 0.05 mM IPTG und 50 μ l/Agarplatte einer X-Gal-Lösung (25 mg 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid in 1.25 ml N,N-Dimethylformamid , s. Schleif a. Wensink, 1981; S.200) enthielten, platiert und 24 h bei 37°C bebrütet.

3.2.22.2. Induktion in Flüssigmedium

Der mit puC 18- oder puR 290-Derivaten transfizierte *E. coli*-Stamm JM 109 wurde in LB-Medium in Gegenwart von 50 μ g/ml Ampicillin in einem Volumen von 5 ml bis zu einer optischen Dichte (gemessen bei 550 nm) von 0.5 gezüchtet und 1.5 ml als uninduzierte Kontrolle entnommen. Anschließend wurde das β -Galaktosidasegen durch Zusatz von IPTG (0.5 mM) und 0.5 mM $ZnCl_2$ (Butterworth a. Korant, 1974) und weitere Bebrütung bei 37°C für die Dauer von 1.5 Stunden induziert. Wieder wurden 1.5 ml der Kultur entnommen und zusammen mit den nicht-induzierten Kontrollen in einer Eppendorffzentrifuge 5' pelletiert. Nichtinduzierte Zellen wurden in 100 μ l, induzierte Zellen in 200 μ l Kochpuffer (7.5 mM TRIS pH 6.8, 3% SDS, 4.5% Saccharose, 5% Mercaptoäthanol, 0.25% Bromphenolblau) 10' gekocht und auf Raumtemperatur abgekühlt. Pro Geltasche wurden, soweit nicht anders vermerkt, 20 μ l der Proteinlösung aufgetragen.

3.2.23. SDS-PAGE zur Auftrennung von Proteinen (Laemmli, 1970)

Die mit SDS denaturierten Proteine wurden in vertikalen Polyacrylamidgelen (12 cm breit, 13 cm lang, 1.5 mm dick), die zwischen 2 Glasplatten eingespannt waren, aufgetrennt. Zunächst wurden die in Kochpuffer aufgetragenen Proteine in einem 2 cm-langen Sammelgel (0.125 M TRIS pH 6.8/ 0.1% SDS/ 5% Acrylamid/ 0.1% N,N'-Methylenbisacrylamid/ 0.07% TEMED/ 0.025% APS als Starter der Polymerisation) scharf bandiert und anschließend im darauffolgenden Trenngel (0.375 M TRIS pH 8.8/ 0.1% SDS/ 8% Acrylamid/ 0.16% N,N'-Methylenbisacrylamid/ 0.03% TEMED/ 0.025% APS als Starter der Polymerisation) separiert. Als Elektrophoresepuffer diente 0.192 M Glycin/ 0.025 M TRIS pH 8.2/ 1% SDS. Die Stromstärke betrug im Sammelgel 15 mA und im Trenngel 30 mA, der Gellauf war nach 4 h (nach Ankunft des Bromphenolblauamarkers am unteren Rand des Gels) beendet. Liefen die Gele über Nacht, dann betrug die Stromstärke im Sammelgel unverändert 15 mA, aber im Trenngel nur 10 mA. Als Marker diente ein Gemisch von β -Galaktosidase (116 Kd), Phosphorylase b (94 Kd), BSA (67 Kd) und Carb. Anhydrase (30 Kd).

3.2.24. Proteinfärbung mit Coomassie-Blau

Ein Teil der Gele wurde zur Sichtbarmachung der Proteinbanden 10' in Färbelösung (0.4% Coomassie-Blau in 50% TCA) geschüttelt und anschließend 18 h in 20% Methanol/ 7% Essigsäure entfärbt.

3.2.25. Transfer von SDS-PAGE-separierten Proteinen auf Nitrozellulosefilter und Inkubation mit Antiseren (Tobwin et al., 1979; Burnett, 1981; Barinaga et al., 1981)

3.2.25.1. Proteintransfer

Nichtgefärbte Proteine wurden zwischen 2 Kohleplatten in Tobwin-Puffer (18g Glycin, 3.75g Trisma-Base und 150 ml Methanol auf 1.000 ml auffüllen) bei einer Stromstärke von 0.3-0.5 A (Dauer 4 h) elektrophoretisch auf Nitrozellulose übertragen.

3.2.25.2. Herkunft bzw. Herstellung antiHAV-positiver Seren

Im "Westernblot"-Verfahren (s. 3.2.25.3.) wurden folgende Seren (Gabe von V. Gauß-Müller) eingesetzt:

- a) antiHAV-positives humanes Rekonvaleszentenserum. Titer: ca. 1:100.000 im antiHAV-IgM-Test der Firma Abbott (HAVAB-M), der nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt wurde.
- b) antiHAV-negatives Präimmunserum aus dem Kaninchen.
- c) antiHAV-positives Kaninchenserum.

Dieses Serum wurde folgendermaßen hergestellt:

HAVinfizierte Zellen aus ca. 70 Zellkulturflaschen (insgesamt 6000 cm²) wurden aufgebrochen und daraus Virus isoliert und gereinigt (s. 3.2.1.). Die gesamte Virusmenge wurde in 4 Portionen (entsprechend je etwa 20-25 µg Protein) aufgeteilt. Zu den Zeitpunkten 0, 10, 20 und 30 Tage wurde ein Kaninchen mit je einer der 4

Portionen subkutan mit dem kompletten Freund-Adjuvans immunisiert. Am 50. Tag nach Beginn der Immunisierung wurde das Serum entnommen. Es hatte eine Titer von ca. 1:5.000 (im antiHAV-Kompetitionstest HAVAB der Firma Abbott, der nach den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt wurde). Weitere Charakteristika des Serums sind in 4.2.5.4.1. beschrieben.

3.2.25.3. Inkubation filtergebundener Proteine mit Antisera

Nach dem Transfer wurde die Nitrozellulose 2-4 h bei Raumtemperatur in Cohenpuffer (0.1% Ficoll/ 0.1% Polyvinylpyrrolidon-360/ 0.1% NP-40/ 1.5% BSA/ 0.05% Gelatine/ 20 mM TRIS pH 7.4/ 2% Glycerin) abgesättigt und anschließend in 0.85% NaCl/ 0.01 M TRIS pH 7.4 (ca. 50 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$) in Gegenwart von Human- bzw. Kaninchenserum (1:70 bis 1:100 verdünnt) bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Danach wurden die Filter 4x 15' bei Raumtemperatur in 0.5% Albumin/ 0.2% Gelatine/ 0.02% Tween 20/ 0.05 M TRIS pH 7.4 gewaschen und dann 2 h in 0.85% NaCl/ 0.01 M TRIS pH 7.4/ peroxidasemarkiertes anti-human-IgM- bzw. anti-Kaninchen-Ig-Serum (Verdünnung 1:600) bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Filter erneut 4x wie oben gewaschen wurden, konnten durch Zugabe der Substratlösung (0.04% Diaminobenzidin/ 50 mM TRIS pH 7.4/ 0.01% H_2O_2) nach 5 bis 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur Protein-Antikörper-Komplexe sichtbar gemacht werden. Die Filter wurden mit Wasser gespült, getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.26. Präparation von bakteriellem Gesamtzellprotein für den Einsatz in einem RIA

Die Klone wurden in jeweils 100 ml Kulturmedium wie in 3.2.22.2. induziert und pelletiert (15', 4.500 Upm, Sorvall). Das Pellet wurde nach einem Waschschrift (10 mM TRIS pH 7.5/ 30 mM NaCl) in 2 ml 50 mM TRIS pH 7.5/1% SDS suspendiert und die Zellen nach Zusatz von Lysozym (4 mg/ml) 10' bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2-maligem Frieren/Tauen der Zellen wurde Aceton bis zu einer Konzentration von 80% zugesetzt, die Mischung 10' in Trockeneis stehen gelassen und danach 20' bei 7.500 Upm (Sorvall) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml H₂O suspendiert und erneut mit Aceton (80%) gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation in Trockeneis wurde das Gemisch wieder 20' pelletiert (7.500 Upm, Sorvall) und das resultierende Pellet 5' bei 37°C getrocknet. 250 µl des in 0.5% Triton X-100/50 mM TRIS pH 8.0 suspendierten Pellets wurden in einem RIA (3.2.27.) eingesetzt.

Zur Bestimmung der Löslichkeit der Fusionsproteine wurden 100 µl des suspendierten Pellets bei Raumtemperatur zentrifugiert (10' bei 7.500 Upm, Sorvall) und Überstand und Pellet durch SDS-PAGE (3.2.23.) und "Westernblot" (3.2.25.) analysiert.

3.2.27. Hepatitis A-Antigen-Radioimmuno-Assay (HAAg-RIA)

Wenn nicht anders vermerkt, sind die in dieser Arbeit mit "RIA" bezeichneten Tests HAAg-RIA (nach Frösner et. al., 1977) und wurden folgendermaßen durchgeführt:

Polystyrolkugeln wurden mit Antikörpern aus antiHAV-positivem Humanserum beschichtet. Nach 3 Waschschritten wurde die auf HAV zu untersuchende Suspension (und HAAG-positive bzw. HAAG-negative Kontrollen) zu den Kugeln gegeben. Nach der Inkubation (über Nacht bei Raumtemperatur) wurden die Plastikkugeln gewaschen und mit einer gereinigten Präparation von humanem IgG (hohe Konzentration von antiHAV-Antikörper, radioaktiv markiert mit 150.000 cpm ^{125}J , der Firma Abbott) versetzt. Nach weiterer Inkubation (6h bei 37°C) wurden die Kugeln erneut gewaschen und die gebundene Radioaktivität bestimmt.

4. ERGEBNISSE

TEIL I

4.1. Reverse Transkription von HAV-RNA, Klonierung von HAV-cDNA und physikalische Kartierung von HAV-cDNA-Klonen

4.1.1. Reinigung und Reinheitsprüfung der viralen Nukleinsäure

Da HAV in Zellkultur verglichen etwa mit PV (Replikationszyklus 6-8 h; Koch a. Koch, 1985; S. 209) ungewöhnlich langsam repliziert und relativ langsam reife Viruspartikel erzeugt, mußten die infizierten Alexanderzellen (PLC/PRF/5) 4-5 Wochen lang inkubiert werden, um einen optimalen Virustiter zu erreichen. HAV übt keinen cytopathischen Effekt auf die Wirtszelle aus, ist also nicht in der Lage, die Zelle zu lysieren. Es war daher erforderlich, die infizierten Zellen zur Ernte der Viruspartikel durch mehrmaliges Frieren und Tauen aufzubrechen, um Virus isolieren zu können (vgl. 3.2.1.). Die Ausbeute an gereinigter RNA (vgl. 3.2.2.) aus geernteten und gereinigten Viruspartikeln lag nach Phenolisierung bei etwa 1-5 µg RNA/25 Kulturflaschen (je 85 cm²). Nach mehrmaliger Umfällung der Nukleinsäure mit Äthanol wurde ein Aliquot (ca. 10%) mit Glyoxal denaturiert und in einem Agarosegel auf Reinheit und Intaktheit getestet (vgl. 3.2.17.3.). Abb.2 zeigt das Testgel einer RNA-Präparation: Neben der ribosomalen

RNA aus Hühnerembryofibroblasten (CEF) (18 S, 28 S) ist die HAV-RNA zu sehen (32 S), die offenbar intakt und im wesentlichen frei von kontaminierenden Nukleinsäuren ist.

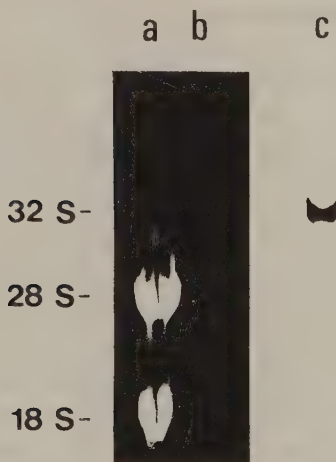


Abb.2:

Spur (a) = CEF-RNA (ca. 3 μ g); Spur (b) = HAV-RNA (ca. 0.1 μ g); Die Spuren (a) und (b) zeigen die mit Glyoxal denaturierte, gelseparierte und Ethidiumbromid-gefärbte RNA (vgl. 3.2.17.3.). In Spur (c) wurde 1/5 der in (b) aufgetragenen RNA-Menge eingesetzt, ohne Anfärbung in einem "Northernblot" (vgl. 3.2.18.2.) auf Nitrozellulose übertragen und gegen den "nicktranslatierten" (vgl. 3.2.16.5.), zufällig ausgewählten Klon 2470 (s. Abb. 17) hybridisiert (vgl. 3.2.19.).

Um eine genauere Vorstellung von der Größe des HAV-Genoms zu bekommen (vgl. hierzu Siegl and Frösner, 1976), wurde HAV-RNA und PV-RNA nach Denaturierung mit Glyoxal im Agarosegel verglichen (Abb.3): HAV-RNA wandert etwas langsamer als PV-RNA und scheint demnach etwas größer als diese zu sein (PV-RNA ist ca. 7.500 B lang), es ist aber auch denkbar, daß durch Unterschiede im (GC)-Gehalt der Genome der beiden Spezies der Grad der Denaturierung differiert (Glyoxal bindet nur an Guanosin).

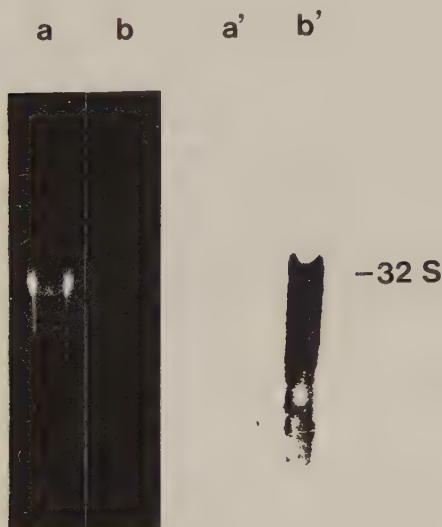


Abb.3:
Spur (a) = PV-RNA (ca.0.2 µg); Spur (b) = HAV-RNA (ca.0.1 µg); In den Spuren (a) und (b) ist die glyoxal-denaturierte, gelseparierte und Ethidiumbromid-gefärbte RNA dargestellt. In den Spuren (a') und (b') wurde die separierte RNA ohne vorherige Färbung auf Nitrozellulose übertragen und gegen den zufällig ausgewählten Klon 2589 (s. Tab. 7) hybridisiert.

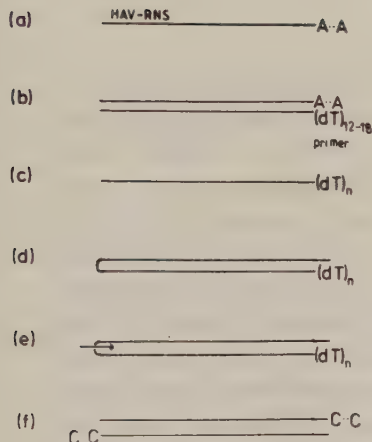
4.1.2. Reverse Transkription der HAV-RNA mit Hilfe von oligo(dT) und Klonierung der HAV-cDNA

Auf Reinheit und Intaktheit getestete RNA wurde nach (modifizierten) Standardmethoden revers transkribiert. Zunächst wurde versucht, mit der reversen Transkriptase (R.T.) aus AMV eine Transkription von möglichst langen Genombereichen zu erzielen. Das Enzym R.T. ist nicht zu einer de novo-Synthese an einer einzelsträngigen (ss-) Nukleinsäure befähigt, vielmehr benötigt es einen partiell doppelsträngigen (ds-) Bereich mit einem freien 3'-OH-Ende für den Transkriptionsstart. Die HAV-RNA wurde daher in Gegenwart von oligo(dT) revers transkribiert. Oligo(dT) hybridisiert an den poly(A)-Strang der RNA und liefert der R.T. ein freies 3'-OH-Ende, prägt damit den Startpunkt der reversen Transkription (fungiert als "Primer"). Abb 4/1 zeigt eine Zusammenfassung der Schritte, die zur Herstellung doppelsträngiger cDNA (ds-cDNA) mit Hilfe von oligo(dT) nötig und im Teil "Methoden" (3.2.) genau erläutert sind.

4.1.2.1. Reverse Transkription von HAV-RNA mit R.T. und Alkaliverdau der RNA

Etwa 1 µg HAV-RNA wurden in Gegenwart von oligo(dT) mit einer Ausbeute von etwa 30% (bezogen auf das Gewicht der eingesetzten RNA) revers in ss-cDNA transkribiert (vgl. 3.2.3.1.) und ein Aliquot davon (2-5%) auf einem alkalischen Agarosegel (vgl. 3.2.17.2.) getestet. Bei einem pH-Wert des Laufpuffers von 12-12.5

I.



II.

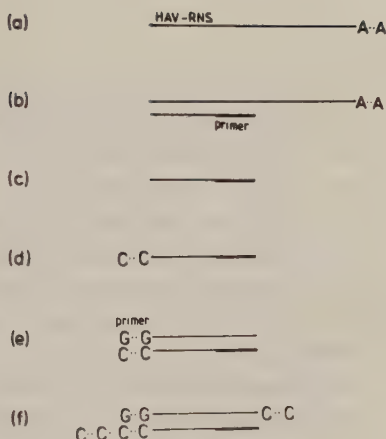


Abb. 4:

Schema der cDNA-Klonierung. Teil I: "Primer" = oligo(dT); Teil II: "Primer" = ein cDNA-Fragment; I.(a) und II.(a) = HAV-RNA (mit polyA); I.(b) und II.(b) = ss-cDNA-Synthese; I.(c) und II.(c) = Alkaliverdau der RNA; I.(d) = ds-cDNA-Synthese (Klenow); I.(e) = S1-Nuklease-verdau; I.(f) = Homo(dC)-Polymer-Synthese; II.(d) = Homo(dC)-Polymer-Synthese; II.(e) = ds-cDNA-Synthese mit R.T.; II.(f) = Homo(dC)-Polymersynthese.

werden Sekundärstrukturen einzelsträngiger cDNA (ss-cDNA) aufgebrochen und die Transkripte gemäß ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Autoradiogramme von solchermaßen aufgetrennter ss-cDNA zeigten, daß in den meisten Präparationen die cDNA-Moleküle eine Länge von etwa 1000-1500 Basen (B) aufwiesen und die Häufigkeit

von Molekülen mit Längen von 1000 B bis hinauf zu etwa 8000 B kontinuierlich abnahm (ohne Abb.). Daher wurde angenommen, daß es keine bevorzugten Stellen des Kettenabbruchs während der reversen Transkription gibt, die auf Sekundärstrukturen der HAV-RNA hinweisen würden. In Abschnitt 4.1.4.2.1. konnte jedoch die Existenz von bevorzugten Stopstellen der R.T. während der Transkription im 5'-nahen Genombereich gezeigt werden. (Die Bezeichnungen 3' bzw. 5' bestimmen die Kartierungsposition von cDNA-Fragmenten relativ zum 3'- bzw. 5'-Ende der HAV-RNA).

4.1.2.2. Synthese von ds-cDNA mit Klenow-Polymerase

Ohne eine Größenselektion der ss-cDNA-Moleküle vorzunehmen, wurde nun mit Hilfe der Klenow-Polymerase ds-cDNA synthetisiert (vgl. 3.2.5.). Dieses Enzym kann das freie 3'-Ende des Erststranges für die Synthese der ds-cDNA benutzen. Man nimmt an, daß das 3'-Ende über eine Haarnadelstruktur von kurzer dynamischer Halbwertszeit als "Primer" (s.o.) fungiert. Entgegen der Vermutung, daß sich diese Initiationsstruktur nur bei ungewöhnlich niedrigen Temperaturen (15°C) und langer Inkubationsdauer (über 10 h) mit ausreichender Wahrscheinlichkeit bildet, konnte eine Syntheseleistung von 90% (bezogen auf das Gewicht der ss-cDNA) auch bei 37°C in 30' erreicht werden. Die Klenow-Polymerase kann bei Reaktionstemperaturen um 37°C auch den von ihr synthetisierten Strang als Matrize für eine weitere Synthese benutzen und dadurch verzweigte ds-cDNA ("snap-back"-Strukturen) erzeugen. Es war daher an-

schließlich eine Behandlung mit S1-Nuklease notwendig, die Einzelstrangregionen spaltet.

4.1.2.3. S1-Nukleaseverdau von ds-cDNA

S1-Nuklease spaltet unter definierten Bedingungen nur einzelsträngige DNA, wie sie an Haarnadelstrukturen und an den Verzweigungspunkten von "snap-back"-Produkten vorliegt. Durch S1-Nukleaseverdau (vgl. 3.2.6.) wurde daher ein Auftreten von Klonen, die Repetitionen enthalten, weitgehend ausgeschlossen. S1-Nuklease verdaut in hoher Konzentration auch ds-DNA. In Pilotexperimenten wurde die optimale S1-Nuklease-Konzentration zu 5 U/ng ds-cDNA bestimmt (ohne Abb., Versuchsprotokoll jedoch identisch mit dem in Abschnitt 4.1.4.1.2. und Abb.9 beschriebenen Experiment).

Abb.5 zeigt das Autoradiogramm eines alkalischen Gels, in dem die Produkte der ds-cDNA-Synthese unverdaut und mit S1-Nuklease verdaut aufgetrennt wurden: Die ds-cDNA sollte im Idealfall eine maximale Molekülgröße von ca. 15.000 B ohne bzw. 7.500 B mit S1-Nuklease-Behandlung aufweisen. Abb.5 macht aber deutlich, daß auch interne Spaltungen (vermutlich an den Verästelungen der "snap-back"-Produkte, s.o.) erfolgt sein müssen, da die maximale Molekülgröße durch den S1-Nuklease-Verdau mindestens um den Faktor 4-5 abnimmt und nach der Behandlung bei etwa 2.000 B liegt.

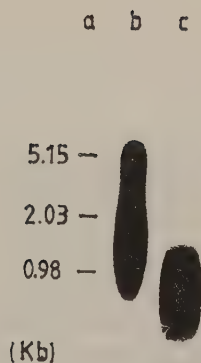


Abb. 5:

Spur (a) = Molekulargewichts-Marker (vgl. 3.2.17.5.);
 Spuren (b) und (c) = Autoradiogramm von unverdauter (b)
 und mit S1-Nuklease verdauter (c) ds-cDNA nach Auf-
 trennung im Alkaligel.

4.1.2.4. 3'-Homopoly(dC)-Synthese

Zunächst wurde die Reaktion der terminalen Transferase (TdT), die Homopoly(dC)-Stränge an die ds-cDNA knüpft, in einem Pilotexperiment optimiert. Da bekannt ist, daß längere Homopoly(dC)-Abschnitte in *E.coli* instabil sind (Peacock et al., 1981), mußte die Homopoly(dC)-Synthese auf eine Stranglänge von 15-30 dC-Resten/3'-Ende der DNA begrenzt werden (vgl. 3.2.7.).

Die Reaktion, die unter Enzymüberschuß abläuft, ist praktisch nur noch von der Substratkonzentration und

nicht von der DNA-Konzentration abhängig (Deng a. Wu, 1981), die ausgearbeiteten Bedingungen liefern demnach auch mit wesentlich niedrigeren DNA-Konzentrationen vergleichbare Ergebnisse. Diese Voraussetzung muß gegeben sein, da die Anzahl der 3'-Enden in der heterogenen ds-cDNA-Molekülpopulation nicht kalkuliert werden kann. Um den Verlust von cDNA-Klonen auf Grund zu langer Homopoly(dC)-Stränge zu vermeiden, wurden dCTP und dTTP in einem Verhältnis von 50:1 eingesetzt (vgl. 3.2.7.1.), sodaß die Homopoly(dC)-Sequenzen von dT-Resten unterbrochen werden.

4.1.2.5. Transfektion von pBR 322-cDNA-Hybridplasmiden in E. coli

Die um Homopoly(dC)-Enden (mit dT durchsetzt) erweiterte ds-cDNA wurde einer Säulenchromatographie (vgl. 3.2.10.2.) unterworfen. Das Säuleneluat enthielt ca. 50 ng ds-cDNA, die in 10 Fraktionen (à 300 µl) enthalten war. Die Fraktionen 1-3 (ca. 10 ng ds-cDNA) wurden mit je 15-30 ng oligo(dG)-pBR 322 hybridisiert (vgl. 3.2.9.) und in E.coli Stamm DH 1 transfiziert (vgl. 3.2.13.). Nachfolgend ein typisches Transformationsprotokoll:

Ultragel A4-Säulenfraktion 1 (2 ng ds-cDNA) + 15 ng oligo(dG)-pBR 322 ergeben nach Transfektion 2169 tetracyclinresistente Klone. In einem Kontrollexperiment (ohne cDNA) wurden nur 180 Klone beobachtet. Die Transformationsrate errechnet sich zu $(2169 - 180) \times 500 = 10^6$ Klone/µg cDNA. Geht man nun davon aus, daß die cDNA-Moleküle im Mittel 1000 Bp und der Vektor pBR 322 ca. 4000 Bp lang sind, dann kann diese Transformations-

rate auf die eingesetzte Plasmidmenge bezogen werden:
 $(2169 - 180) \times 100 = 2 \times 10^5$ Klone/ μ g Plasmid. Diese Rate liegt um einen Faktor 200 niedriger als die in der Positivkontrolle ermittelte Transformationsrate von 4×10^7 Klonen/ μ g pBR 322, ein Hinweis darauf, daß die nicht kovalent geschlossenen Hybridplasmide in vivo vermutlich schneller von Nukleasen angegriffen werden als kovalent geschlossene Plasmide. Dennoch konnten aus 10 ng ds-cDNA über 4.000 tetracyclinresistente Klone erhalten werden.

4.1.3. Identifizierung und Grobkartierung von oligo(dT)-geprägten cDNA-Klonen

Zunächst wurde Plasmid-DNA von 276 zufällig ausgewählten HAV-cDNA-Klonen präpariert (vgl. 3.2.15.) und als Gesamtplasmid (cDNA + Vektor) an Nitrozellulosefilter gebunden ("dot-blot"; vgl. 3.2.18.3.). Dann wurden 2 unterschiedliche Typen von Hybridisierungsproben gegen die Nitrozellulose-Filter hybridisiert (vgl. 3.2.19.1.).

Die erste cDNA-Probe wurde unter Verwendung von oligo(dT) als "Primer" hergestellt und soll im folgenden als dT-cDNA bezeichnet werden. Die cDNA-Moleküle dieser Probe sollten an ihrem 5'-Ende komplementär zum poly(A)-Strang am 3'-Ende des HAV-Genoms sein.

Die zweite Probe ist das Produkt einer cDNA-Synthese, in der ein Zufalls-"Primer" (engl.: "random-primer") aus Kalbsthymus-DNA eingesetzt wurde, und wird als r.p.-cDNA bezeichnet. Die cDNA-Moleküle dieser Synthese weisen kein gemeinsames 5'-Ende auf und repräsentieren das gesamte HAV-Genom. Da die meisten cDNA-Moleküle der

beiden Hybridisierungsproben von subgenomischer Länge sind, hybridisieren 3'-ferne cDNA-Klone schwächer gegen dT-cDNA als 3'-nahe Klone. r.p.-cDNA hybridisiert gleichermaßen gegen 3'-ferne und 3'-nahe Klone. Beide cDNA-Proben waren nachweislich HAV-spezifisch (s.u.). Abb.6 zeigt schematisch die Unterschiede der dT-cDNA- und r.p.-cDNA-Hybridisierungsproben. Diese Proben wurden nacheinander gegen zwei Filter hybridisiert, auf die Plasmid-DNA von zufällig ausgewählten Klonen aufgebracht war. Die Autoradiogramme der beiden Hybridisierungsexperimente sind in Abb.7 gezeigt.

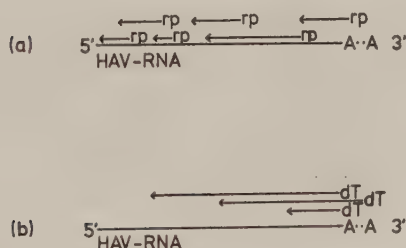


Abb.6:

Vergleich von dT-cDNA und r.p.-cDNA (schematisch).

a) ss-cDNA-Synthese mit "random-primer"; b) ss-cDNA-Synthese mit oligo(dT) als "Primer". dT = oligo(dT); r.p. = "random-primer"; A...A = poly(A)-Strang der HAV-RNA; Pfeile bezeichnen ss-cDNA-Moleküle.

b (dT-cDNA)

c (r.p.-cDNA)

Q

b (dT-cDNA)

c (r.p.-cDNA)

[illegible]

"Dot-blot"-Hybridisierung mit markierter dT-cDNA (Autoradiogramme I.(b) und II.(b)) und r.p.-cDNA (Autoradiogramme I.(c) und II.(c)). Die Anordnung der mit den cDNA-Proben hybridisierenden cDNA-Klone ist in I.(a) für Filter I und in II.(a) für Filter II wiedergegeben. Klon 2032 in Autoradiogramm I.(c) und Klon 3117 in Autoradiogramm II.(c) sind zur Orientierung mit Pfeilen gekennzeichnet. Nicht hybridisierende Klone sind nicht gekennzeichnet.

Nur 23 cDNA-Klone (8.3%) hybridisierten mit einer der beiden cDNA-Proben. Über 90% der Klone dieser cDNA-Präparation sind demnach nicht HAV-spezifisch. Die r.p.-cDNA- und dT-cDNA-Hybridisierungsproben, die nach einer Standardpräparation von HAV-RNA (vgl. 3.2.1., 3.2.2.) revers transkribiert wurden, waren dagegen HAV-spezifisch: 11 der 23 Klone, die miteinander der beiden

cDNA-Proben hybridisierten, wurden in "Southern"-Blot- (vgl. 4.1.6.1.) und "Northern"-Blot-Experimenten (vgl. 4.1.5.) untersucht; alle 11 Klone enthalten HAV-cDNA. Daher kann der hohe Anteil nicht HAV-spezifischer Klone nicht auf die reverse Transkription von zellulärer RNA zurückgeführt werden. Vielmehr dürften die nicht identifizierten Klone aus Verunreinigungen von zellulärer DNA in den HAV-RNA-Präparationen stammen. Eine weitere wichtige Frage, die mit diesem Experiment beantwortet werden sollte, ist die nach der Kartierungsposition der Klone entlang des HAV-Genoms relativ zum 3'-Ende des Genoms. Tab.1 gibt eine Übersichtliche Zusammenfassung der in Abb.7 gezeigten Hybridisierungsdaten.

Ein Großteil der Klone hybridisiert in gleichem Maß gegen dT-cDNA wie gegen r.p.-cDNA. Die Klone 2059, 2006, 1917 und 3117 hybridisieren relativ schwach gegen dT-cDNA. Klon 2032 hybridisiert nicht gegen dT-cDNA. Aus diesen Daten kann die Kartenposition der in Tab.1 angeführten Klongruppen relativ zum 3'-Ende der HAV-RNA bestimmt werden:

3'-Ende - Klongruppe A - Klongruppe B - Klongruppe C - 5'-Ende.

Die Daten der Tab.1 zeigen, daß oligo(dT) unter den gegebenen Versuchsbedingungen die cDNA-Synthese vor allem am poly(A)-Strang der viralen RNA prägt und ein "random-primer" die cDNA-Synthese auch intern initiiert.

Tab.1:

Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse mit dT- bzw. r.p.-cDNA (-/ +/ ++/ +++ bezeichnet die Intensität der Hybridisierungssignale, siehe Abb.7; n = nicht getestet). dT-cDNA enthielt Moleküle mit einer Länge von mindestens 2.000 B (in der Hybridisierung gegen Klon 2589 Moleküle von 500-2.000 B), r.p.-cDNA enthielt Moleküle mit einer Mindestlänge von 1.000 B. Die Konzentration und spezifische Aktivität der Hybridisierungsprobe war in allen Ansätzen in etwa gleich.

<u>Hybridisierungsprobe:</u>	<u>dT-cDNA</u>	<u>r.p.-cDNA</u>
<u>Klongruppe A:</u>		
1998/2588/2580/3087/		
3111/1975/3144/3147/		
1953/1993/3128/3130/	+++	++
3121/2036/3155/2014/		
3719/3730		
2589	+++	n
<u>Klongruppe B:</u>		
3117/1917/2059/2006	+	++
<u>Klongruppe C: 2032</u>		
	-	++

Da die dT-cDNA-Probe nur Moleküle mit einer Mindestlänge von 2.000 B enthält, sollte die Klongruppe A der Tab.1 auf Grund der relativ starken Hybridisierung gegen dT-cDNA maximal in einem Abstand von 2.000 B vom 3'-Ende kartieren. Diese Vermutung konnte später durch

physikalische Kartierung der cDNA-Klone bestätigt werden (vgl. Tab.7): Aus der Gruppe B der Tab. 1 wurden die Klone 3117 und 2059 in einem Mindestabstand von 3.3 bzw 3.1 Kb und Klon 2032 in einem Abstand von 5.6 Kb vom 3'-Ende des HAV-Genoms kartiert.

Die Vermutung, daß dT-cDNA, die als analytische Probe verwendet wurde, wegen der erniedrigten dCTP-Konzentration (vgl. 3.2.3.3.) im Mittel kürzere cDNA-Moleküle enthält als die cDNA, die präparativ kloniert wurde, wird durch diese Resultate unterstützt.

Da nicht genügend HAV-RNA zur Verfügung stand, um alle cDNA-Klone durch Hybridisierung gegen dT-cDNA und r.p.-cDNA zu charakterisieren, wurde im Folgenden ein anderer Weg beschritten: Ein Gemisch der oben beschriebenen (HAV-positiven) Klone 2580, 2588, 3087, 3111, 3117, 3128, 3130, 3155, 3730 und 1998 (s. Tab.1, Klongruppen A und B) wurde durch "nick-translation" (vgl. 3.2.16.5.) radioaktiv markiert und in einer Koloniehybridisierung ("Grunstein-Hogness"; vgl. 3.2.18.4./3.2.19.) gegen mehrere Tausend Klone einer cDNA-Klonierung hybridisiert; als Beispiel einer Koloniehybridisierung sind in Abb.8 zwei Nitrozellulose-Filter mit insgesamt 102 Klonen (13 Positive) gezeigt.

Die DNA einiger Klone, die in der Koloniehybridisierung als HAV-positiv ermittelt wurden, wurde radioaktiv markiert und wiederum gegen mehrere Tausend filtergebundene Bakterienkolonien hybridisiert. Alle so ermittelten positiven Klone wurden schließlich durch Restriktionsenzym-Verdau (vgl. 3.2.16.3.) der Plasmid-DNA auf die Größe der insertierten cDNA hin untersucht.

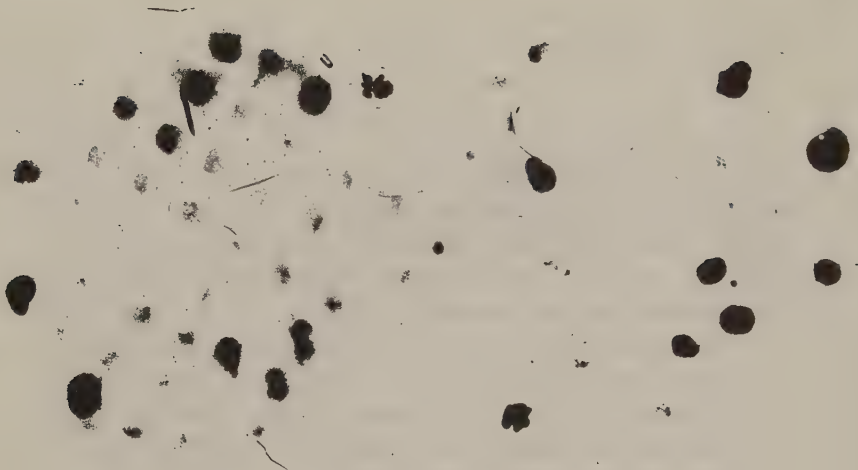


Abb.8:

Autoradiogramm von 2 Nitrozellulose-Filtern nach Koloniehybridisierung (Hybridisierungsprobe: s. Text). Alle Klone zeigen eine schwache Hintergrundhybridisierung, 13 Klone sind eindeutig positiv.

Die DNA der größten cDNA-Klone wurden durch "Southern"-Blot-Hybridisierung (vgl. 3.2.18.1./3.2.19.) und Restriktionsenzymverdau feinkartiert. So konnte eine zusammenhängende Restriktionskarte von 0 - 4 Kb (gerechnet vom 3'-Ende des HAV-Genoms) erstellt werden (mit Klon 3831 als dem am weitesten vom 3'-Ende des Genoms entfernten Klon). Außerdem wurden jenseits dieses Bereiches 1.1 Kb durch die Klone 2032 und 2470 abgedeckt, deren genaue Kartenposition (5.15 -6.25 Kb vom 3'-Ende) erst später ermittelt wurde (s. Abb. 16).

4.1.4. Reverse Transkription von HAV-RNA mit Hilfe von Restriktionsenzym-Fragmenten als "Primer" und Klonierung von HAV-cDNA

Da die Klonierungsexperimente, in denen oligo(dT) als "Primer" fungierte, keine durchgehende physikalische Karte des HAV-Genoms lieferten, wurden die Lücken durch weitere Klonierung von HAV-cDNA geschlossen. Restriktionsenzym-Fragmente von HAV-cDNA-Klonen, die in unmittelbarer Nähe von noch nicht klonierten Genomabschnitten kartieren, wurden gegen HAV-RNA hybridisiert und der R.T. als "Primer" angeboten. Die reverse Transkription startete daher nicht am 3'-Ende des Genoms, sondern unmittelbar vor den noch nicht kartierten Genombereichen ("primer-extension").

4.1.4.1. Überbrückung der Kartierungslücke zwischen Klon 3831 und den Klonen 2032/2470.

4.1.4.1.1. "Primer-extension" mit R.T.

Das 200 Bp lange Restriktionsenzym-Fragment, das von der EcoRI-(4.35 Kb vom 3'-Ende) und der NcoI-Schnittstelle (4.55 Kb vom 3'-Ende) erzeugt wird (s. Abb.17), wurde aus dem kleinsten von PSTI generierten Fragment des Klon 3831 (Größe: 0.55 Kbp) geschnitten und isoliert. Ca. 1 µg des Fragments wurden zusammen mit 0.2 µg HAV-RNA denaturiert und hybridisiert. Die nachfolgende reverse Transkription lieferte (bezogen auf das Gewicht der eingesetzten RNA) 13% ss-cDNA (vgl. 3.2.3.4.). Bezieht man die Syntheseleistung auf den der

R.T. zur Verfügung stehenden Genomabschnitt (ca. 3 Kb), dann errechnet sich eine Synthese von 32%. Dieser Wert ist der Syntheseleistung in der oligo(dT)-geprägten Reaktion (30%) vergleichbar und stellt ein in der Literatur angegebenes Optimum dar (Maniatis et al., 1982; S.233). Nach Alkaliverdau der HAV-RNA (vgl. 3.2.4.) wurde wie mit oligo(dT)-geprägter cDNA verfahren (vgl. 4.1.2.2. bis 4.1.2.5.). Die Synthesestrategie ist in Abb. 4/II, (a)-(c) und Abb.4/I (d)-(f) verdeutlicht.

4.1.4.1.2. ds-cDNA-Synthese mit Klenow-Polymerase und S1-Nukleaseverdau der ds-cDNA

Die Zweitstrangsynthese wurde mit Klenow-Polymerase mit einer Ausbeute von 100% (bezogen auf das Gewicht der ss-cDNA) durchgeführt. Abb.9 zeigt die Austestung der im nächsten Schritt eingesetzten S1-Nuklease: Spur 2 zeigt unverdaute ds-cDNA, die im denaturierten Zustand eine maximale Länge von ca. 6.0 - 6.5 Kb aufweist. Das entspricht (auf Grund der Haarnadelstruktur an einem Ende der ds-cDNA) etwa der doppelten Länge des revers transkribierten Genombereiches (ca. 3.0 Kb). Obwohl bereits 3 Einheiten S1-Nuklease/ng cDNA die maximale Molekülgröße um den Faktor 2 auf etwa 3 Kb senken und damit vermutlich die meisten endständigen DNA-Schleifen spalten, wurden für die anschließende S1-Nuklease-Inkubation 10 Einheiten Enzym/ng cDNA (Abb.9, Spur 4) eingesetzt, um sicherzustellen, daß alle "snap-back"-Produkte der Klenow-Polymerase (vgl. 4.1.2.2.) verdaut werden.

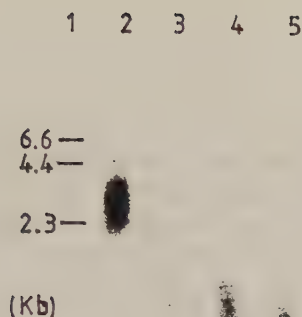


Abb. 9:

Autoradiogramm von ds-cDNA nach Verdau mit S1-Nuklease und Separation im Alkaligel. Spur (1) = Molekulargewichts-Marker (vgl. 3.2.17.5.); Spur (2) = 0 Einheiten S1-Nuklease; Spur (3) = 3 Einheiten S1-Nuklease; Spur (4) = 10 Einheiten S1-Nuklease; Spur (5) = 30 Einheiten S1-Nuklease.

4.1.4.1.3. 3'-Homopoly(dC)-Synthese und Transformation von E. coli

Die S1-nukleasebehandelte cDNA (ca. 35 ng) wurde mit 3'-dC-Homopolymerenden versehen. Nach präparativer Säulenchromatographie zur Selektionierung der längsten cDNA-Moleküle wurden ca. 8 ng cDNA mit dem Vektor pBR 322 hybridisiert und in E.coli DH1 transfektiert. Die erhaltenen Klone wurden gegen die Klone 2470 und 2032 hybridisiert, um ihre HAV-Spezifität zu prüfen und gleichzeitig cDNA-Klone zu selektionieren, die die

Kartierungslücke zwischen Klon 3831 und Klonpaar 2032/2470 schließen. Von über 900 Klonen hybridisierten 25 mit Klon 2470 und 9 mit Klon 2032 in einer Kolonie-hybridisierung (vgl. 3.2.18.4./3.2.19.). Durch physikalische Kartierung ("Southern"-Blot-Hybridisierung, vgl. 3.2.18.1./3.2.19.; Restriktionsenzymanalyse, vgl. 3.2.16.3.) wurde gezeigt, daß die Lücke zwischen den Klonen 3831 und 2470 durch Klon 8101 überbrückt und eine kontinuierliche Restriktionskarte von 0 Kb - 6.65 Kb (vom 3'-Ende) aufgestellt werden konnte. Die wichtigsten Klone aus dieser cDNA-Synthese sind 8101, 8451, 8096, 8374 und 8476. Klone 8374/8476 (die praktisch identisch sind) liegen dem 5'-Ende des HAV-Genoms am nächsten.

4.1.4.2. Klonierung des Genombereichs von 6.65 Kb (vom 3'-Ende des HAV-Genoms) bis zum 5'-Ende des Genoms

4.1.4.2.1. "Primer-extension"

0.5 µg HAV-RNA wurden mit 1 µg des 0.4 Kbp großen, von PSTI erzeugten, Restriktionsenzym-Fragments von Klon 8476 hybridisiert (vgl. 3.2.3.4.). Dieser Klon war mit einem Abstand von annähernd 6.5 Kb vom genomischen 3'-Ende zu diesem Zeitpunkt der dem 5'-Ende am nächsten gelegene Klon und wurde daher als "Primer" für ein "primer-extension"-Experiment ausgewählt. Die Wahl fiel auf dieses Fragment, weil das zweite PSTI-Fragment dieses Klonen (6.45 - 6.65 Kb vom 3'-Ende) am 3'-Ende des zur RNA komplementären Stranges durch ein (dC)-Homopolymer blockiert und daher als "Primer" ungeeignet ist. Die reverse Transkription (vgl. 3.2.3.4.) lieferte

15 ng Erststrang-cDNA, was bezogen auf den verfügbaren Genombereiches von nur ca. 1 Kb 24% der maximal erreichbaren Synthese entspricht. Ein Aliquot der Erststrang-cDNA wurde im Alkaligel (vgl. 3.2.17.2.) aufgetrennt und autoradiographiert: Abb.10, Spur 2 zeigt die Syntheseprodukte, die sich in wenigstens 4 Banden konzentrieren. Eine Bande von etwa 1.4 Kb dürfte der maximal möglichen Länge der ss-cDNA entsprechen (vgl. 4.1.6.3.2.). Drei weitere Banden (Größe: 1.2 Kb/0.8-0.9 Kb/0.6 Kb) weisen auf Sekundärstrukturen der HAV-RNA hin, an denen die R.T. besonders häufig von der RNA dissoziiert und die Synthese einstellt.

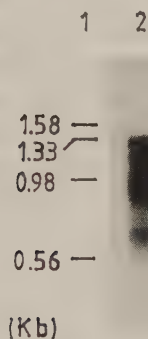


Abb.10:
Autoradiogramm von ss-cDNA (nach "primer-extension") nach Separation im Alkaligel. Spur (1) = Molekulargewichts-Marker (vgl. 3.2.17.5.); Spur (2) = ss-cDNA.

4.1.4.2.2. Homopoly(dC)-Synthese und Synthese von ds-cDNA mit R.T.

Um die cDNA-Klonierung des äußersten 5'-Endes des HAV-Genoms zu ermöglichen, wurde auf die S1-Nuklease-Behandlung verzichtet (da S1-Nuklease die cDNA-Haarnadelstruktur und damit die zum 5'-Ende des HAV-Genoms komplementäre cDNA abbaut) und durch folgende Schritte ersetzt: Nach der Erststrangsynthese wurde durch eine etwas modifizierte TdT-Reaktion (verkürzte Inkubationsdauer, verringerte Enzymkonzentration) die ss-cDNA mit einem kurzen Homopoly(dC)-Strang am 3'-Ende versehen (vgl. 3.2.7.1.), der in der folgenden Zweitstrang-Rücksynthese zur Bindung eines oligo(dG)-"Primers" diente. Im Reaktionsansatz für die Zweitstrangsynthese wurde die Klenow-Polymerase durch R.T. ersetzt (vgl. 3.2.8.), da R.T. kaum verzweigte DNA-Produkte ("snap-back"-Artefakte) erzeugt. Klenow-Polymerase erzeugt häufig "snap-back"-Artefakte, und kann daher zur ds-cDNA-Synthese nur dann eingesetzt werden, wenn diese Artefakte durch anschließenden S1-Verdau abgebaut werden können (vgl. 4.1.2.2.).

4.1.4.2.3. Homopoly(dC)-Synthese und Transfektion der pBR 322-cDNA-Hybridplasmide in E. coli

Die abschließende Anknüpfung der (dC)-Homopolymere an die 3'-Enden der DNA erfolgte unter den bereits beschriebenen Bedingungen (4.1.2.4.). In Abb.4/II ist eine schematische Übersicht der erforderlichen Schritte gegeben. Etwa 20 ng der erhaltenen doppelsträngigen cDNA wurden in den Vektor hybridisiert und in E.coli

DH1 transfiziert (vgl. 4.1.2.5.). Über 1.500 Klone wurden durch Hybridisierung gegen ein von PSTI erzeugtes Restriktionsenzym-Fragment des Klonen 8476 (6.45-6.65 Kb vom 3'-Ende) auf ihre Spezifität hin geprüft. Etwa 10% der Klone zeigten spezifische Hybridisierung und wurden näher charakterisiert. Die wichtigsten Klone dieser Reihe sind 9280, 9451, 8519, 9948, 9068 und 9676 (s. Tab.7).

4.1.5. Prüfung der Spezifität der cDNA-Klone

Um sicherzustellen, daß die isolierten Klone HAV-spezifische cDNA enthalten, wurde eine Reihe von Klonen in einem "Northern"-Experiment (3.2.18.2./3.2.19.) gegen gereinigte HAV-RNA (vgl. 3.2.1./3.2.2.) hybridisiert. Diese Vorgehensweise läßt keine falsch-positiven Ergebnisse zu, da das Hybridisierungssignal einer RNA, die durch ihr Laufverhalten im Agarosegel charakterisiert ist, zugeordnet werden kann. 7 cDNA-Klone oder Klonfragmente zeigten ein starkes Hybridisierungssignal gegen im Gel aufgetrennte und filtergebundene HAV-RNA in einer Höhe von 32 S, wie es für HAV charakteristisch ist (s. Abb.2). Klon 2589 (s. Tab.7) wurde zusätzlich gegen gelseparierte, filtergebundene Poliovirus-RNA hybridisiert; ein Signal konnte nicht entdeckt werden (Abb.3).

Die Resultate der "Northern"-Hybridisierung sind in Tab.2 zusammengefaßt. Alle in dieser Arbeit aufgeführten Klone, deren Kartenposition bestimmt wurde (s. Tab.7), hybridisieren direkt oder über einen dritten cDNA-Klon mit den Klonen der Tab.2.

Neben diesen Hybridisierungsdaten gibt es eine Reihe weiterer Argumente, die zusammengenommen die Authentizität der cDNA-Klone beweisen:

Jeder Reinigungsschritt der Viruspartikel-Präparation (vgl. 3.2.1.) wurde durch einen Radioimmuno-Assay (3.2.27.) kontrolliert und nur HAV-Antigen enthaltende Fraktionen weiterverwendet.

Von allen bekannten Viren, deren Genom aus einem RNA-Molekül von 32S besteht, ist nur HAV nicht in der Lage, in Gewebekultur einen cytopathischen Effekt auf die Wirtszelle auszuüben.

HAV benötigt im Gegensatz zu allen anderen Viren mit einem Genom von 32S zur Produktion eines nennenswerten Virustiters in Gewebekultur eine bis mehrere Wochen. Zum Vergleich: Poliovirus lysiert die Wirtszelle bereits 6-8 Stunden nach Infektion (Koch a. Koch, 1985; S.209). Da HAV-infizierte Zellen auch mehrere Wochen nach der Infektion nicht lysiert wurden, war eine Kontamination des HAV-Inokulums mit einem lysierenden Virus praktisch ausgeschlossen.

Zudem bewies die Nukleotidsequenzanalyse repräsentativer cDNA-Klone die Authentizität der cDNA (Lezius, Wimmer, Ostermayr, von der Helm; unveröffentlichte Daten).

4.1.6. Feinkartierung durch "Southern"-Blot-Hybridisierung und Analyse von Restriktionsenzym-Fragmenten

4.1.6.1. "Southern"-Blot-Hybridisierung und Festlegung des genomischen 3'-Endes.

Nachdem die HAV-Spezifität der Klone sichergestellt

Tab.2

Ergebnisse der Northern-Hybridisierungen: (-) = keine Hybridisierung; (+) = positive Hybridisierung; (n) = nicht getestet).

	<u>HAV</u>	<u>PV</u>
<u>Hybridisierungs-</u>		
<u>probe:</u>		
2589	+	-
1998	+	n
3117	+	n
2032	+	n
2470	+	n
3831	+	n
9280 (das von PSTI erzeugte 0.2Kb-Fragment)	+	n

war, wurde zunächst durch PSTI-Verdau und anschließender Gelaufentrennung (s. Abb.11/a) die Klongröße bestimmt. Durch Hybridisierung von cDNA-Insertionen der Klone gegen Nitrozellulose-gebundene cDNA (Koloniehybridisierung, vgl. 3.2.18.4./3.2.19.; "Southern"-Blot-Hybridisierung, vgl. 3.2.18.1./3.2.19.) wurde die exakte Reihenfolge und die Orientierung der Klone relativ zueinander bestimmt. In Tab.3 sind die wichtigsten Hybridisierungsdaten zusammengestellt. Als Hybridisierungsproben dienten durch "nick-translation" (3.2.16.5.) oder mit terminaler Transferase (3.2.7.2.) markierte cDNA-Insertionen. Im zweiten Fall wurden

Gesamt-cDNA-Insertionen endmarkiert und anschließend durch Nachspaltung mit Restriktionsenzymen ein Endfragment isoliert.

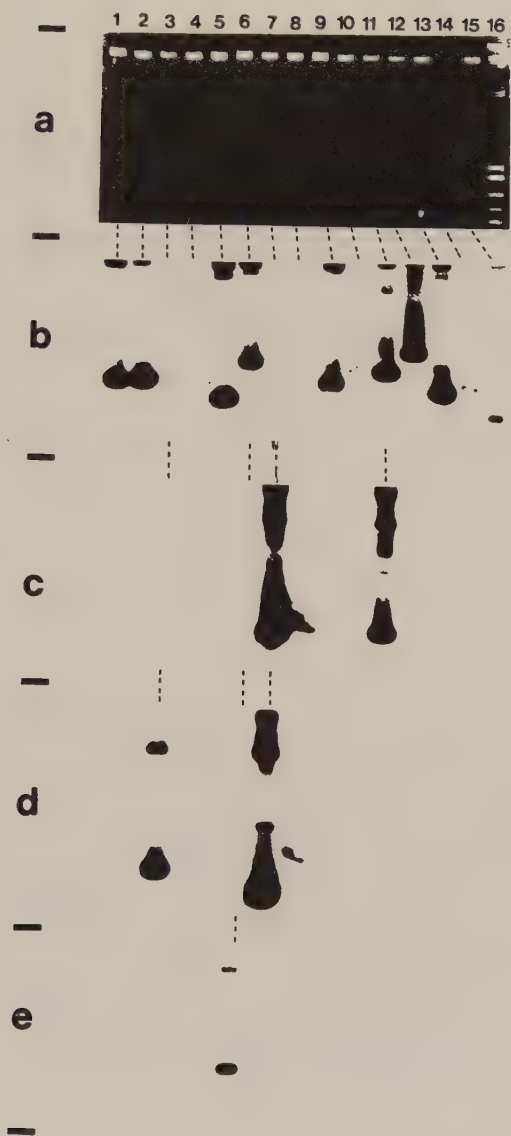
Ein Beispiel eines "Southern"-Blot-Experiments, das der Feinkartierung von cDNA-Klonen diene, ist in Abb.11 wiedergegeben: Die Daten der Abb.11 sind auch in Tab.3 enthalten. Auf die Kartierung des Klones 2014 wird in Abschnitt 5. eingegangen. Durch die Existenz eines poly(A)-Strangs am 3'-Ende des HAV-Genoms war die Möglichkeit gegeben, durch Hybridisierung mit poly(dT) Klone an diesem Ende zu kartieren. Dazu wurde oligo(dT)₁₂₋₁₈ radioaktiv endmarkiert (vgl. 3.2.7.2.) und gegen mehrere Klone hybridisiert.

Abb.11:

(a) = Ethidiumbromid-gefärbtes Agarosegel der mit PSTI gespaltenen und gelseparierten Plasmid-DNA verschiedener cDNA-Klone. (b)-(e) = Hybridisierung der in (a) gezeigten DNA nach Bindung an Nitrozellulose.

Die Klone: Spur (1) = 3155; Spur (2) = 3130; Spur (3) = 3128; Spur (4) = 3117; Spur (5) = 3111; Spur (6) = 3087; Spur (7) = 2589; Spur (8) = 2588; Spur (9) = 2580; Spur (10) = 2059; Spur (11) = 2014; Spur (12) = 1998; Spur (13) = 1975; Spur (14) = 1953; Spur (15) = 1903; Spur (16) = Molekulargewichts-Marker (vgl. 3.2.17.5.).

Die Hybridisierungsproben: (b) = Klon 1998; (c) = Klon 2589 (PSTI-0.6/5'); (d) = Klon 2589 (PSTI-0.4/3'); (e) = poly(dT). Zur Nomenklatur der cDNA-Fragmente siehe Tab.3.



Auf Grund der im Vergleich zu GC-Paarungen um ca. 1/3 schwächeren Wasserstoffbrückenbindung in AT-Paaren wurde die Hybridisierungstemperatur auf 32°C und die Waschtemperatur auf 20°C gesenkt (vgl. 3.2.19.2.). Tab.4 und Abb.11 zeigen, daß nur 1 von 15 Klonen ein signifikant positives Signal zeigt (Klon 3087). Wurde poly(dT) unter Standardbedingungen hybridisiert, zeigt auch Klon 3087 kein Signal, da sich bei 42°C keine stabilen poly(dA):poly(dT)-Hybride bilden. Offenbar besitzt nur Klon 3087 aus dieser Gruppe einen poly(dA:dT)-Bereich und muß daher am 3'-Ende des HAV-Genoms angesiedelt werden.

Tab.3:

Zusammenstellung der wichtigsten DNA-Hybridisierungsdaten. (= >) = positive Hybridisierung; (# >) = Ausbleiben eines Hybridisierungssignals. Die Lage von cDNA-Fragmenten ist in Klammern angegeben: (Restriktionsenzym - Größe des Fragments in Kbp / Lage des Fragments), wobei die Benennungen (3') bzw. (5') endständige Fragmente und deren Orientierung bezüglich der HAV-RNA bezeichnen. Wird eine cDNA-Insertion von einem Enzym in 3 Fragmente gespalten, so bezeichnet (m) das Mittelfragment. Ist ein Fragment aus 2 Spaltungen hervorgegangen, dann wird in Klammern zunächst die Lage des cDNA-Fragments aus der 1. Spaltung und anschließend die Orientierung des hybridisierten Fragments zu diesem cDNA-Fragment angegeben. In einigen Fällen wird die Lage des hybridisierten cDNA-Fragments durch Abzählen der Restriktionsenzym-Fragmente vom 3'- oder 5'-Ende der gespaltenen cDNA angegeben.

2589 => 3128/3422
 2589(PST I-0.4/3') => 3422/6260(PST I-0.1/3')/3128
 2589(PST I-0.6/5') => 7131/2673(PST I-0.65/5')/
 3286/6260(PST I-0.7/5')
 2589(PST I-0.6/5') => 3422/3223
 2032 => 2470
 3155(PST I-0.2/5') => 3422/1975(PST I-0.25/5')
 7131 => 2014/6645/2673/7948/
 3286/2589(PST I-0.6/5')/
 3831(PST I-1.7/m)
 7131 => 3223/2059
 3117 => 6115/6401/3223/3831(PST I-1.7/m)
 3117 => 6645/3286
 6115/6401 (Bemisch) => 5980/7948/3831(PST I-1.7/m)
 3831(PST I-1.7/m) => 6115/6401/3223/3286/7131/
 2589(PST I-0.6/5')/
 6645/3117/2059/2014
 3831(PST I-0.8/3') => 3422/2673(PST I-0.6/3')
 5980 => 6115/3831(PST I-1.7/m)
 7948(Hinf I-0.55/5') => 7131(Hinf I-0.4/5')/
 6401(Hinf I-0.45/3')
 7948(Hinf I-0.55/5') => 6115/5980/3117
 7948(Hinf I-0.3/3') => 7131(Hinf I-0.35/2.Frag.v.5'-
 Ende)/2673(PST I-0.85/5')
 Hinf I-0.35/3')/3831(PST I-
 1.7/m)(Hinf I-0.35/3')
 6115(Hinf I-0.25/5') => 5980(Hinf I-0.35/2.Frag.v.5'-
 Ende)
 7131(Hae III-0.3/5') => 2673(PST I-0.85/5')Hinf I-
 0.5/5')/3831(PST I-1.7/m)
 Hinf I-0.8/2.Frag.v.3'-Ende)
 5980(Xba I-0.25/3') => 5980(Hinf I-0.25/3')/6401(Hinf
 I-0.45/3')/6115(Hinf I-0.35/3')
 2470 => 6101/8096
 3831(PST I-0.55/5') => 8101
 3831(PST I-0.55/5') => 8096
 2032 => 8374/8476
 2470/8096 => 8374/8476
 2673(PST I-0.85/5') => 6401
 1998 => 3155(PST I-0.5/3')/3130/
 3111/3087/2580/2014/
 1975(PST I-0.5/3')
 8101(Bam HI+Nco I-
 0.11/3') => 3831(PST I-0.55/5')
 8476(PST I-0.2/5') => 9280/8425/8519/9451
 2032(Hinf I-0.5/5') => 8476/8374/2470(Hinf I-0.26/5')
 2032(Hinf I-0.1/3') => 2470(Hinf I-0.22/m)
 2032(Hinf I-0.1/3') => 8476/8374
 9280(PST I-0.2/5') => 9948(PST I-0.2/5')/9068(PST I-
 0.2/5')/9676(PST I-0.2/5')

Tab.4

Hybridisierung von cDNA-Klonen gegen poly(dT)

positiv: 3067

negativ: 3115/3130/3128/3117/3111/2589/

2588/2580/2059/2014/1998/1975/1953

Die meisten der untersuchten cDNA-Klone hybridisieren nicht gegen poly(dT) und enthalten daher keine längeren poly(dA)-Abschnitte, die vom poly(A)-Trakt der HAV-RNA herrühren. Diese Klone sind möglicherweise durch Bindung des oligo(dT)-"Primers" an kurze A-reiche Stellen der HAV-RNA während der ss-cDNA-Synthese entstanden. Kurze dA-reiche Abschnitte der cDNA-Klone bleiben im "Southern"-Blot-Experiment mit poly(dT) als markierter Probe unentdeckt.

Es ist aber auch denkbar, daß oligo(dT) die ss-cDNA-Synthese primär am poly(A)-Trakt der HAV-RNA prägt und daß während der weiteren Klonierungsschritte die cDNA durch sekundäre Ereignisse fragmentiert wird, sodaß viele cDNA-Moleküle den poly(dA)-Anteil verlieren (vgl. 6.1.).

4.1.6.2. Analyse von Restriktionsenzym-Fragmenten der cDNA-Klone

Die cDNA-Klone wurden durch die Analyse der Spaltprodukte nach Verdau durch Restriktionsenzyme (vgl. 3.2.16.3.) feinkartiert. Dazu wurden die cDNA-Insertionen der Plasmide oder die gesamte Plasmid-DNA voll-

ständig oder partiell mit je 1-2 Restriktionsendonukleasen gespalten und das resultierende Fragmentgemisch gelelektrophoretisch analysiert. Einige cDNA-Plasmidinsertionen wurden vor dem Enzymverdau mit TdT radioaktiv endmarkiert (vgl. 3.2.7.2.).

4.1.6.2.1. Verdau von Plasmidinsertionen mit einem Restriktionsenzym

Durch Verdau mit nur einem Restriktionsenzym wurde zunächst die Anzahl der Enzymspaltstellen und die DNA-Fragmentgröße bestimmt. Darüberhinaus konnten aber auch Schnittstellen in der Umgebung von authentischen PSTI-Spaltstellen (deren Erkennungssequenz in der Sequenz der HAV-RNA enthalten ist) lokalisiert werden, wenn wenigstens 2 Klone unterschiedlicher Größe diese natürliche PSTI-Stelle und die zu kartierende Schnittstelle überstreichen. Auf diese Weise wurden folgende Restriktionsspaltstellen lokalisiert (in Klammern die Position, d.h. der Abstand vom 3'-Ende des Genoms, der Spaltstellen): PvuII (2.05 Kb), HincII (2.25 Kb), PvuII (2.33 Kb), HaeIII (2.85 Kb), NdeI (6.25 Kb) und NcoI (7.45 Kb); (vgl. Abb.17).

Die Vorgehensweise sei kurz an Hand der HaeIII-Erkennungsstelle an Position 2.85 Kb erläutert: Die Klone 2589, 2673 und 3831 überstreichen die PSTI-Stelle an Position 2.4 Kb (s. Tab.7). Aus Hybridisierungsergebnissen konnte gefolgert werden, daß ein 1.7 Kbp-Fragment des Klons 3831, ein 0.9 Kbp-Fragment des Klons 2673 und ein 0.65 Kbp-Fragment des Klons 2589 an der erwähnten PSTI-Stelle beginnen und sich in unterschiedlichem Ausmaß in die 5'-Richtung des Genoms erstrecken.

Wurden nun diese Fragmente mit Nuklease HaeIII gespalten, dann war in jedem Fall ein Fragment von 0.43 Kbp und je ein weiteres Fragment unterschiedlicher Größe zu beobachten. Damit war der Abstand dieser HaeIII-Erkennungsstelle von der PSTI-Erkennungsstelle (Position 2.4 Kb) eindeutig bestimmt.

4.1.6.2.2. Restriktionsenzym-Verdau von Gesamtplasmid-DNA

4.1.6.2.2.1. Vollständige Spaltung von Gesamtplasmid-DNA

Die PSTI-Schnittstelle an Position 4.05 Kb wird nur von Klon 3831 überstrichen. Die Position der XbaI-Erkennungsstelle an Position 3.55 Kb und das Schnittmuster des PSTI-Fragments der Größe 0.55 Kbp (4.05-4.60 Kb vom 3'-Ende) des Klons 3831 war bekannt (NcoI erzeugt Fragmente von 0.50 und 0.05 Kbp). Die Orientierung dieses PSTI-Fragments war hingegen nicht bekannt. Da das Plasmid pBR 322 keine NcoI-Erkennungsstelle besitzt, konnte die Polarität dieses Fragmentes durch einen kombinierten XbaI/NcoI-Verdau des Gesamtplasmids bestimmt werden. Diese Spaltung erzeugt neben einem hochmolekularen Spaltprodukt ein DNA-Fragment von ca. 1.0 Kbp. Die NcoI-Erkennungsstelle des 0.55 Kbp-Fragments muß daher an Position 4.55 Kb liegen.

4.1.6.2.2.2. Partielle Spaltung von Gesamtplasmid-DNA

Zur vorläufigen Bestimmung der Reihenfolge der 3 von PSTI erzeugten DNA-Fragmente des Klons 3831 (Größe: 1.7

Kbp, 0.8 Kbp, 0.55 Kbp) wurde Gesamtplasmid unvollständig mit PSTI gespalten (vgl. 3.2.16.3.) und im Agarosegel aufgetrennt. Neben den Endprodukten der Spaltung konnten 2 unvollständig gespaltene Produkte, deren Größe etwa der Summe von 1.7 Kbp + 0.55 Kbp bzw. 1.7 Kbp + 0.8 Kbp entsprach, jedoch kein Zwischenprodukt von etwa 1.35 Kbp entdeckt werden. Das 1.7 Kbp-Fragment wird demnach von den beiden kleineren Fragmenten flankiert (s. Abb.17).

4.1.6.2.3. Spaltung von cDNA-Plasmidinsertionen mit 2 Restriktionsenzymen

Das Prinzip des doppelten Enzymverdaus, durch den die meisten Restriktionsdaten gewonnen wurden, soll an Hand der Abb.12 erläutert werden: Ein 0.65 Kbp-Fragment des Klons 2589 (2.4-3.05 Kb vom 3'-Ende) wird folgendermaßen gespalten:

HinfI :	0.35 Kbp + 0.28 Kbp
HinfI + HaeIII:	0.35 Kbp + 0.17 Kbp + 0.12 Kbp
HaeIII:	0.47 Kbp + 0.17 Kbp

Die Reihenfolge der Fragmente und der Abstand der Enzymspaltstellen ist dadurch eindeutig determiniert:
0.35 Kbp - HinfI - 0.12 Kbp - HaeIII - 0.17 Kbp

4.1.6.2.4. Vollständige Spaltung endmarkierter cDNA-Insertionen

Verschiedene Klone wurden mit PSTI gespalten und die cDNA-Insertionen isoliert, mit terminaler Transferase

endmarkiert (3.2.7.2.) und mit diversen Enzymen nachgespalten. Nach Gelaufentrennung und Autoradiographie verursachen jeweils nur die beiden endständigen Fragmente eine Schwärzung des Films. In einigen Fällen wurden diese radioaktiv markierten Fragmente aus dem Gel eluiert und mit einem weiteren Enzym gespalten.

Diese Situation wird in Abb.13 am Beispiel der Klone 6115 und 6401 illustriert: Die endmarkierten, endständigen Fragmente beider Kloninsertionen nach einer *Hinf*I-Spaltung wurden isoliert, zur Lokalisierung einer

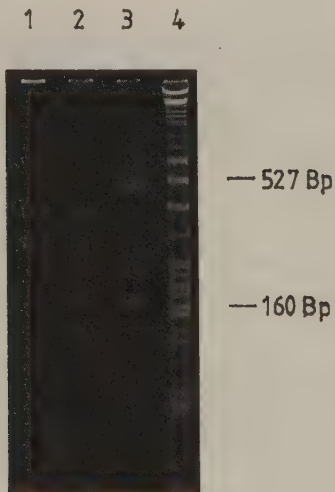


Abb.12:

Ethidiumbromid-Färbung von restringierter DNA des Klon 2589 (PSTI-0.6/5') nach Auftrennung durch PAGE (Fragmentnomenklatur siehe Tab.3). Spur (1) = *Hinf*I; Spur (2) = *Hinf*I/*Hae*III; Spur (3) = *Hae*III; Spur (4) = Molekulargewichts-Marker (vgl. 3.2.17.5.).

HindII-Erkennungsstelle mit diesem Enzym nachgespalten, im Agarosegel aufgetrennt und autoradiographiert. Ein 0.35 Kbp-Fragment (Klon 6115) wird in ein 0.05 Kbp- und ein 0.45 Kbp-Fragment (Klon 6401) in ein 0.15 Kbp-Fragment gespalten. Die Größe des radioaktiv markierten DNA-Stückes markiert zugleich den Abstand der HindII-Erkennungsstelle vom Ende der Klon-cDNA, da nur die beiden Endfragmente der Klon-cDNA eine Markierung tragen. Eine Restriktionskarte der Klone 6115 und 6401 findet sich in Abb.15). Die durch Endmarkierung mit anschließendem Restriktionsenzym-Verdau gewonnenen Daten sind in Tab.5 aufgelistet.

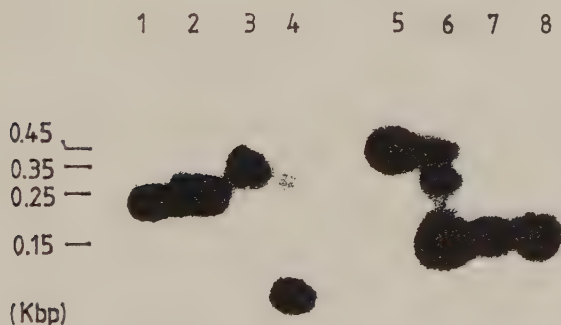


Abb.13:

Autoradiogramm der von HinfI erzeugten Endfragmente der endmarkierten Klone 6115 und 6401 nach weiterer Spaltung durch HindII und Separation im Agarosegel. Spuren (1) und (2) = Klon 6115 (0.25 Kbp); Spuren (3) und (4) = Klon 6115 (0.35 Kbp); Spuren (5) und (6) = Klon 6401 (0.45 Kbp); Spuren (7) und (8) = Klon 6401 (0.15 Kbp). Die Spuren (1), (3), (5) und (7) zeigen die unverdauten, (2), (4), (6) und (8) die mit HindII restrin- gierten DNA-Fragmente (vgl. Tab.5).

Tab.5:

Zusammenstellung der durch Restriktion endmarkierter DNA gewonnenen Daten. Auf der rechten Seite ist die Größe (Kb) der nach Spaltung mit dem jeweiligen Enzym erhaltenen markierten Fragmente angegeben. In einigen Fällen wurde ein endmarkierter Klon mit HinfI gespalten, das in Klammern angegebene Fragment isoliert und mit einem weiteren Enzym nachgespalten, sodaß nur 1 markiertes Fragment entstand (Zur Fragmentnomenklatur siehe Tab.3).

6115 x Hinf I => 0.35 + 0.25
7948 x Hinf I => 0.55 + 0.30
7131 x Hinf I => 0.40 + 0.05
6401 x Hinf I => 0.45 + 0.15
5980 x Hinf I => 0.25 + 0.08
7131(Hinf I-0.40/5') x Hae III => 0.30
6115(Hinf I-0.25/5') x Hind II => 0.25
6115(Hinf I-0.35/3') x Hind II => 0.05
6401(Hinf I-0.45/3') x Hind II => 0.15
6401(Hinf I-0.15/5') x Hind II => 0.15
6115 x Xba I => 0.50 + 0.35
6115 x Xba I/Hind II => 0.50 + 0.05
6115 x Xba I/Ava II => 0.35 + 0.03
3831(PST I-1.7/m) x Xba I => 1.10 + 0.60
" x Xba I/Ava II => 1.10 + 0.15
" x Xba I/Hind II => 0.85 + 0.60
" x Xba I/Hae III => 0.45 + 0.60
" x Hinf I => 0.35 + 0.05
2032 x Hinf I => 0.50 + 0.10
2032 x Hinf I/Sau 3A => 0.03 + 0.10
476(PST I-0.40/3') x Nde I => 0.30 + 0.10
" x Nde I/Sau 3A => 0.09 + 0.10

4.1.6.2.5. Partielle Spaltung endmarkierter cDNA-Insertionen

Zur Bestimmung der Reihenfolge von Restriktionsenzym-Fragmenten wurden 2 Kloninsertionen endmarkiert (vgl. 3.2.7.2.), mit einem Restriktionsenzym, welches die Insertion nur einmal (möglichst asymmetrisch) spaltet, vollständig verdaut und anschließend einer unvollständigen Spaltung durch ein weiteres Enzym unterworfen. Da das Enzym der Erstspaltung so gewählt war, daß nur eines der beiden erzeugten Fragmente die Erkennungsstellen des Enzyms der zweiten Spaltung enthielt, konnte auf eine Trennung der beiden aus der Erstspaltung resultierenden Fragmente verzichtet werden.

Abb.14 verdeutlicht diesen Sachverhalt am Beispiel des mit HindII vollständig (in ein 0.8 Kbp und ein 0.05 Kbp-Fragment) und anschließend mit HinfI partiell gespaltenen Klons 6115: Das 0.8 Kbp-Fragment wird in markierte Fragmente der Größe 0.25 Kbp, 0.35 Kbp, 0.50 Kbp und 0.80 Kbp aufgelöst, während das 0.05 Kbp-Stück ungespalten bleibt. Da interne Fragmente keine Markierung tragen, kann die Größe und Reihenfolge der aufeinanderfolgenden DNA-Fragmente durch die Differenz jeweils zweier benachbarter Banden bestimmt werden: 0.25 Kbp / 0.10 Kbp (0.35 - 0.25 Kbp) / 0.15 Kbp (0.50 - 0.35 Kbp) / 0.30 Kbp (0.80 - 0.50 Kbp) / HindII / 0.05 Kbp.

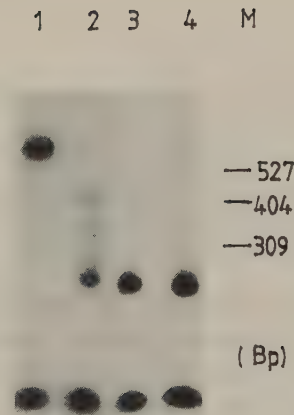


Abb.14:

Kartierung der *Hinf*I-Bruchstücke des mit *Hind*II vollständig verdauten Klones 6115 durch *Hinf*I-Partialspaltung, Agarosegelelektrophorese und Autoradiographie. Die 4 Spuren unterscheiden sich in der Dauer der Einwirkung von *Hinf*I: Spur (1) = 0'; Spur (2) = 5'; Spur (3) = 10'; Spur (4) = 30'; M = Molekulargewichts-Marker (vgl. 3.2.17.5.).

In ähnlicher Weise wurde Klon 5980 zunächst mit *Xba*I in 2 Fragmente von 0.65 bzw. 0.25 Kbp gespalten. Der anschließende Partialverdau (*Hinf*I) lieferte markierte Banden von 0.08 Kbp, 0.42 Kbp, 0.52 Kbp und 0.65 Kbp; das 0.25 Kbp-Stück blieb ungespalten. Auf Grund der oben angestellten Überlegungen ergibt sich eine eindeutige Reihenfolge der Fragmente: 0.08 Kbp - 0.34 Kbp - 0.10 Kbp - 0.13 Kbp - *Xba*I - 0.25 Kbp.

Die Ergebnisse der partiellen Spaltung von endmarkierter Klon-cDNA sind in Tab.6 zusammengestellt.

Tab.6:

Auflistung der durch partielle Spaltung von endmarkierter cDNA gewonnenen Daten. Fragmentgrößen in Kbp.

$$6115 \times \text{HindII} \Rightarrow 0.80 + 0.05$$

$$6115 \times \text{HindII} \times \text{HinfI}_{\text{partial}} \Rightarrow 0.05 + 0.25 + 0.35 + 0.50 + 0.80$$

$$5980 \times \text{XbaI} \Rightarrow 0.65 + 0.25$$

$$5980 \times \text{XbaI} \times \text{HinfI}_{\text{partial}} \Rightarrow 0.25 + 0.42 + 0.52 + 0.65 + 0.08$$

4.1.6.3. Feinkartierung besonders intensiv studierter Genombereiche

4.1.6.3.1. Feinkartierung im Bereich von 2.4 Kb bis 4.05 Kb vom 3'-Ende des Genoms

Die in 4.1.6.2.4. und 4.1.6.2.5. erläuterten Kartierungsmethoden liefern auf Grund der Streuung der radioaktiven Strahlung nur sehr ungenaue absolute DNA-Fragmentgrößen, sodaß sie nur in Zusammenhang mit anderen Daten der Restriktionsenzymanalyse (vgl. 4.1.6.2.1. bis 4.1.6.2.3.) brauchbare Resultate liefern. Daher wurden die in den letzten beiden Abschnitten zusammengestellten Resultate durch diese Daten erweitert und abgesichert. Die Ergebnisse sind in Abb.15 in Form einer maßstabsgetreuen Restriktionskarte wiedergegeben. Auf einige spezielle Aspekte der in diesem Bereich kartierenden Klone wird in Abschnitt 5. eingegangen.

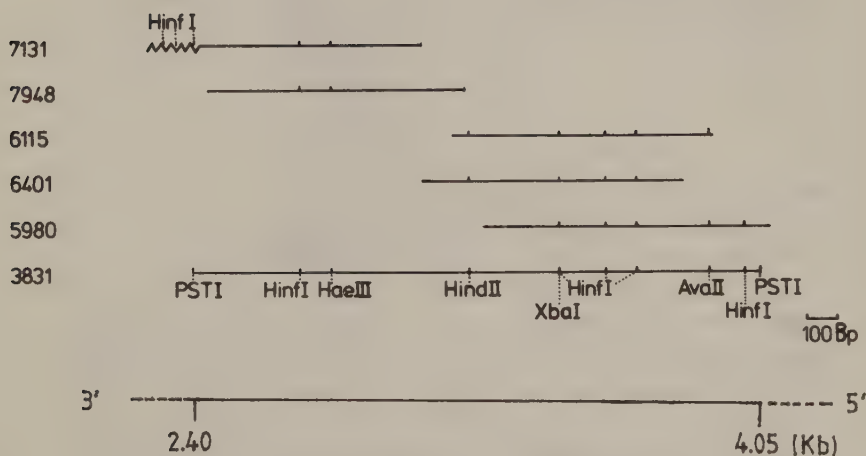


Abb. 15:
Restriktionskarte im Bereich der PSTI-Spaltstellen in Position 2.4 Kb bzw. 4.05 Kb (s. Abb. 17). Eine gezackte Linie (Klon 7131) deutet Unsicherheiten in der Kartierung an (s. Abschnitt 5.).

4.1.6.3.2. Kartierung des 5'-Endes des HAV-Genoms

In allen 3 PV-Serotypen ist eine stabile Haarnadelstruktur in der Nähe des 5'-Endes des Genoms konser-

viert. (Toyoda et al., 1984) und scheint eine wichtige Funktion in der RNA-Replikation auszuüben. Im Hinblick auf spätere Transfektionsversuche, wie sie mit dem klonierten PV-Genom bereits erfolgreich durchgeführt wurden (z.B. Racaniello u. Baltimore, 1981), wurde versucht, das 5'-Ende des Genoms möglichst vollständig zu klonieren. In 4.1.4.2. wurde bereits die Klonierungsmethode vorgestellt, die unter Umgehung des S1-Nukleaseverdaus in der Lage sein sollte, das komplette 5'-Ende der RNA zu reproduzieren: Die ss-cDNA wurde am 3'-Ende mit einem Homopolymer versehen und der Zweitstrang durch ein komplementäres Oligonucleotid geprägt. Abb.16 zeigt die Karte der 7 wichtigsten cDNA-Klone in diesem Genombereich.

Die wichtigsten Argumente, die vermuten lassen, daß das vollständige 5'-Ende des HAV-Genoms in der abgebildeten Karte enthalten ist, sind:

- a) Trotz intensiver Suche konnten keine über das vermutete 5'-Ende hinausreichenden Klone entdeckt werden.
 - b) 4 Klone stimmen in ihrem 5'-Ende gut überein, die Unterschiede von 20 und weniger Basen sind vermutlich auf die unterschiedliche Länge der (dC)-Homopolymere (oder auf einige fehlende Nukleotide am 5'-Terminus) zurückzuführen.
 - c) Die Syntheseprodukte der reversen Transkription nach der Methode des "primer-extension" mit einem Restriktionsenzym-Fragment des Klons 8476 (vgl. 4.1.4.2.1.) zeigen im Alkaligel ein scharfes Längenmaximum der cDNA-Moleküle bei ca. 1.40 - 1.45 Kb (Abb.10).
- Demnach sollte der Abstand der PSTI-Erkennungsstelle (Position 6.45 Kb) ca. 1.0 - 1.05 Kb vom physikalischen

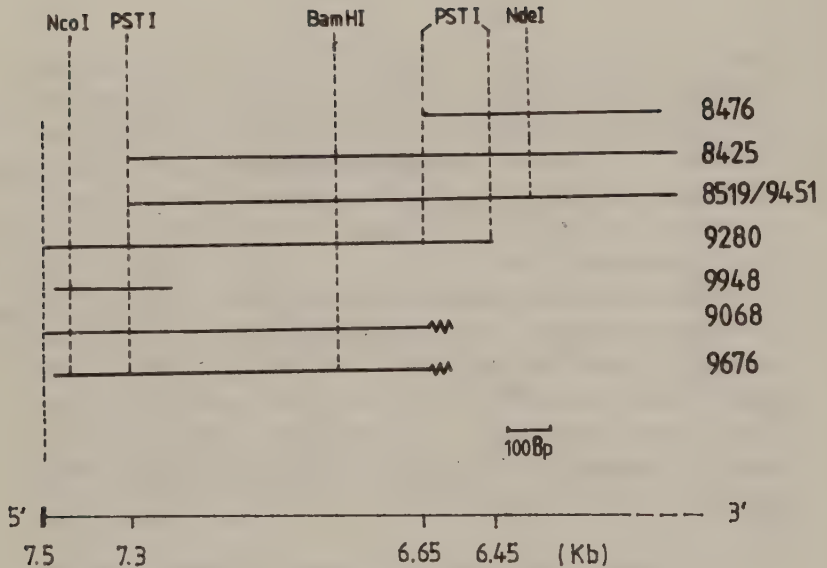


Abb. 16:

Restriktionskarte des 5'-Endes des HAV-Genoms. Ge-
zackte Linien zeigen an, daß an diesen Stellen die
Kartierung der betreffenden Klone nicht abgeschlossen
wurde.

5'-Ende entfernt sein (der "Primer" hat eine Länge von
0.4 Kbp). Dieser Wert korreliert ausgezeichnet mit dem
durch Restriktionsenzym-Analyse ermittelten Abstand von
1.05 Kb, sodaß das genomische 5'-Ende der HAV-RNA ver-

mutlich vollständig kloniert und mit der in Abb.16 eingetragenen Position identisch ist. Aber erst die Sequenzierung der Produkte eines "primer-extension"-Experiments wird die genaue Lokalisierung dieses Genom-terminus' ermöglichen.

4.1.7. Zusammenfassung der Kartierungsergebnisse und Homologiestudien

In Tab.7 sind alle in dieser Arbeit erwähnten Klone und ihre Lage auf der physikalischen Karte des HAV-Genoms erfaßt. Abb.17 zeigt eine Restriktionskarte des gesamten HAV-Genoms mit den wichtigsten Klonen und Enzymspaltstellen.

Aus den Daten der Restriktionsenzymanalyse ermittelt sich die Gesamtlänge des klonierten HAV-Genoms (Isolat MBB) zu 7.5 Kb.

Die inzwischen von anderen Arbeitsgruppen veröffentlichten physikalischen Karten des HAV-Genoms wurden mit der vorliegenden Karte verglichen: Tab.8 gibt für 5 Restriktionsenzyme, die je einen 6er-Block von Basen erkennen, die Anzahl der übereinstimmenden Spaltstellen von 4 klonierten HAV-Genomen an. Zwei Spaltstellen wurden als übereinstimmend bezeichnet, wenn die Kartenposition in etwa identisch und das umgebende Restriktionsenzymspaltmuster (mindestens 2 benachbarte Erkennungsstellen) vergleichbar war. Nach der Formel $S = 2 \cdot n_{xy} / (n_x + n_y)$ (n_x und n_y ist die Anzahl der Spaltstellen in Sequenz x bzw. y; n_{xy} ist die Anzahl der überein-

Tab.7:

Zusammenstellung der Kartierungsdaten aller erwähnten cDNA-Klone. Wurde ein Klon nicht genau kartiert, dann geben die in < > gesetzten Werte den möglichen Kartierungsbereich an. Mit * gekennzeichnete Klone wurden auf Grund ihres Verhaltens in Hybridisierungsexperimenten mit dT-cDNA/r.p.-cDNA als "3'-nah", mit ** gekennzeichnete Klone entsprechend als "3'-fern" eingestuft (vgl. 4.1.3.).

Klon	Größe(Kb)	Kartenposition(Kb vom 3'-Ende)	
7131	1.2	? -3.1	
7948	0.85	2.4-3.25	
6115	0.8	3.2-4.0	
6401	0.8	3.1-3.9	
5980	0.85	3.25-4.1	
3831	3.0	1.6-4.6	
8374	0.6	6.05-6.65	
8476	0.6	6.05-6.65	
8425	1.3	6.0-7.3	
8519	1.25	6.05-7.3	
9451	1.25	6.05-7.3	
9280	1.05	6.45-7.5	
9948	0.35	7.15-7.5	
9068	?	7-7.5	
9676	?	7-7.5	
3087	0.75	0.0-0.75	*
1998	1.0	0.45-1.45	*
7150	0.9	0.95-1.85	
3422	0.8	1.5-2.3	
8101	0.95	4.45-5.4	
2470	0.6	5.15-5.95	
2032	0.65	5.6-6.25	**
2589	1.05	2.0-3.05	
3155	0.7	1.0-1.7	*
3130	0.6	0.8-1.4	*
3128	0.55	1.65-2.2	*
1975	0.75	1.0-1.75	*
2673	1.5	1.8-3.3	
6260	0.6	2.3-3.1	
8096	1.2	4.8-6.0	
8451	1.05	4.9-5.95	
3117	0.5	<3.3-4.05>	**
2059	0.6	<3.1-4.05>	**
6645	0.85	<2.4-3.55>	
3223	0.3	<3.1-4.05>	
3286	0.45	<2.4-3.4>	
2014	0.55		*
3111			*
3719			*
3730			*
2588			*
2580			*
1953			*
3144			*
3147			*
1993			*
3121			*
2036			*
1917			**
2006			**

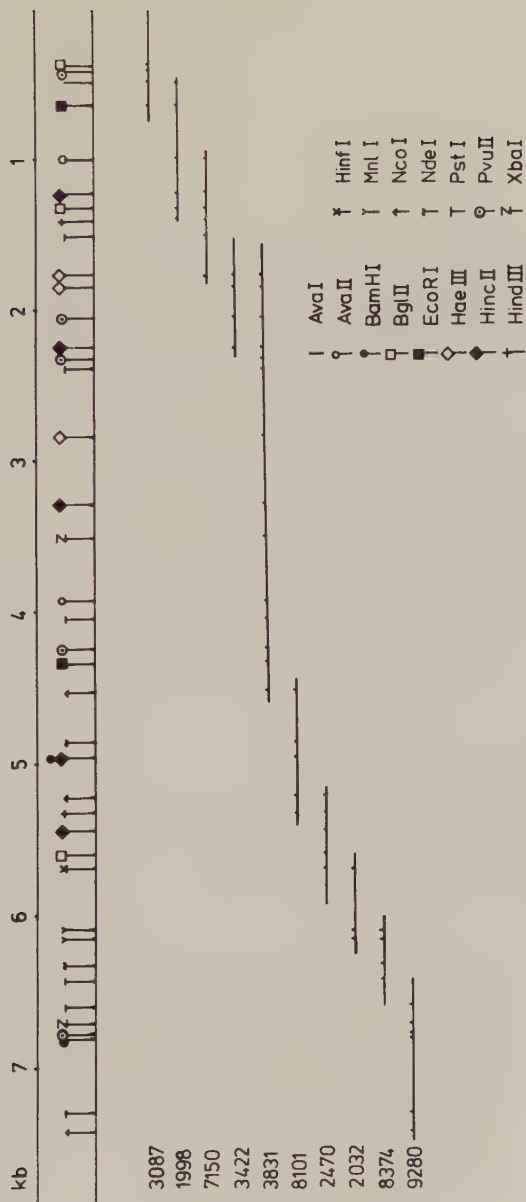


Abb. 17: Restriktionskarte der wichtigsten HAV-cDNA-Klone.

stimmenden Spaltstellen) errechnet sich der Anteil der Übereinstimmungen S und hieraus nach der Gleichung $\lambda = 1 - S^{1/6}$ (für Enzyme, die Hexanukleotide erkennen) die Sequenzdivergenz λ (Nei a. Li, 1979). Die Daten der Tab.8 resultieren in folgenden Divergenzwerten:

MBB - HM 175: 0.03 (=3%)

MBB - CR 326: 0.06 (=6%)

MBB - CRL-LA: 0.04 (=4%)

Diese Werte sind in Einklang mit der Vorstellung daß verschiedene HAV-Isolate auf Grund ihrer Zugehörigkeit zu einem Serotyp sehr nahe verwandt sein müssen.

Tab.8:

Anzahl verschiedener Restriktionsschnittstellen im klonierten Genom von MBB, HM 175 (Ticehurst et al., 1983), CR 326 (Linemeyer et al., 1985) und CRL LA (Najarian et al., 1985). In Klammern die Anzahl der mit Stamm MBB übereinstimmenden Schnittstellen.

	BamHI	Egl II	PSTI	PvuII	XbaI
MBB	2	3	6	5	2
HM 175	2(2)	4(3)	5(5)	6(5)	1(1)
CR 326	4(2)	3(3)	2(2)	5(5)	1(0)
CRL LA			4(4)		

TEIL II

4.2. Expression von HAV-cDNA in E.coli

Nach der Klonierung der HAV-RNA und der physikalischen Kartierung der cDNA-Klone wurde versucht, cDNA-Abschnitte, die Teile des VP1-Gens tragen, in E. coli zu exprimieren. Dazu wurden Restriktionsenzym-Fragmente der cDNA (Abb.19) in prokaryontische Expressionsvektoren eingebaut und die Vektorkonstrukte in die Bakterienzellen geschleust.

Das auf den Vektoren liegende Gen für Resistenz gegen Ampicillin (β -Lactamasegen) erlaubt eine rasche Selektion von plasmidtragenden Bakterienzellen. Die eingesetzten Plasmidvektoren besitzen außerdem die Kontrollregionen des β -Galaktosidase-Gens (Promotor, Operator), die für eine mit IPTG induzierbare Transkription und die Translation benötigt werden, sowie unterschiedlich große Abschnitte des β -Galaktosidase-Strukturgens.

Die HAV-cDNA-Fragmente wurden in das Strukturgen der β -Galaktosidase eingebaut (bei pUC18 am N-Terminus, bei pUR290 am C-Terminus) und in Fusionsproteine mit einem β -Galaktosidase-Anteil am N- bzw. C-Terminus übersetzt. In Abb.18 ist die Struktur der Vektoren pUR 290 und pUC 18 schematisch dargestellt.

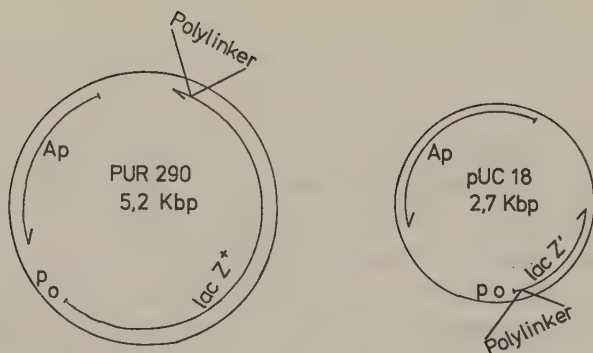


Abb. 18:

Struktur der Plasmidvektoren pUR 290 und pUC 18 (schematisch). Ap = Gen für Ampicillinresistenz; p = Promotor; o = Operator; lac Z⁺ = Gen für β -Galaktosidase; lac Z' = N-terminaler Teil des β -Gal.-Genes; Pfeile bezeichnen die Transkriptionsrichtung.

4.2.1. Reaktionsparameter der Ligation

Alle Expressionskonstrukte wurden durch Ligation des Expressions-Ausgangsvektors mit einem Restriktionsenzym-Fragment eines unter 4.1. dargestellten HAV-cDNA-Klons hergestellt (vgl. 3.2.2i.). Sowohl Ausgangsvektoren als auch cDNA-Insertionen waren an jeweils beiden zu ligierenden Enden von unterschiedlichen Enzymspaltstellen begrenzt, um einer Rezirkularisierung vorzubeugen und die Insertion des cDNA-Fragmentes nur in einer bestimmten Orientierung zu gestatten. Vektoren wurden mit BamHI/PstI gespalten und über ein Agarosegel gereinigt. Die Reihenfolge der Restriktionsspaltstellen war in jedem Fall 5'-BamHI (bzw. NcoI) PstI-3' (bezogen auf die Orientierung des β -Galaktosidasegens). Die cDNA-Insertionen trugen am 5'-Ende eine BamHI-, Bgl II- oder NcoI- und am 3'-Ende eine PstI-

Erkennungssequenz (bezogen auf die Orientierung des HAV-Genoms). Die Vektorkonzentration wurde so gewählt, daß die Zirkularisations- die Konkatemerbildungstendenz überwog ($< 25 \mu\text{g/ml}$; nach Dugaiczyk et al., 1975). Das zu inserierende cDNA-Fragment war in einem 2-3 fachen molaren Überschuß vorhanden.

Alle zu ligierenden Nukleinsäuren waren mit Proteinase K behandelt (vgl. 3.2.16.2), da sich gezeigt hatte, daß nur mit Pheno1/Chloroform deproteinisierte DNA noch Exonukleasen enthielt, die offenbar die freien Enden derart veränderten, daß die Produkte einer Ligation mit den entsprechenden Restriktionsenzymen nicht mehr spaltbar waren.

4.2.2. Auswahl des zu exprimierenden Genombereiches

Da VP1 bei allen bisher untersuchten Picornaviren eine herausragende Rolle in der Virusneutralisation spielt, wurde nur cDNA aus dem Bereich des VP1-Gens (z.T. mit angrenzenden Genombereichen) exprimiert. Da die Genomorganisation von PV und HAV in vielen Aspekten übereinstimmt, wurde angenommen, daß auch die Größe und Lage der Strukturproteine beider Viren homolog ist. Das VP1-Gen sollte demnach etwa 4.0 - 5.0 Kb vom 3'-Ende des HAV-Genoms entfernt liegen.

4.2.3. Bestimmung des Leserasters der Proteinsynthese an den 2 terminalen Restriktionsenzymspaltstellen der cDNA-Insertion

4.2.3.1. Leserasterbestimmung durch Expression

Zunächst wurde Klon 8101 (4.45 - 5.40 Kb vom 3'-Ende) mit BamHI gespalten und das 3'-terminale Fragment (4.45 - 4.95 Kb; vgl. Abb.17) weiter charakterisiert. Da zu diesem Zeitpunkt keine Sequenzdaten vorlagen, wurde das Proteinleseraster des cDNA-Fragments über seine Transkription und Translation in ein Fusionsprotein getestet. Vektor pUC 18 (Gabe v. M. Motz) wurde nach Spaltung mit BamHI/PSTI mit dem BamHI-Fragment des Klons 8101 (Größe: 0.5 Kbp) ligiert. pUC 18 trägt neben einem Ampicillinresistenzgen einen Teil des Genes für die β -Galaktosidase von E.coli (Promotor, Operator, lac z'). Aminosäure 6 und 7 sind durch einen Polylinker getrennt, der die BamHI- und PSTI-Erkennungsstellen trägt. Das Ligationsgemisch wurde in E.coli JM 109 (ein Stamm, der einen hyperaktiven lac-Repressor exprimiert) transfektiert und die Zellen auf X-Gal und geringe Mengen IPTG enthaltende LM-Platten ausgebracht (vgl. 3.2.22.1.). Das Galaktose-Struktur analog IPTG inaktiviert den hyperaktiven lac-Repressor, sodaß er nicht mehr an den lac-Operator bindet und die RNA-Polymerase am benachbarten lac-Promotor die mRNA-Synthese beginnen kann. Tab.9 faßt das Ergebnis zusammen.

Eine blaue Koloniefarbe zeigt an, daß das lac z'-Genprodukt das defekte (chromosomale) β -Galaktosidasegen komplementiert und daher X-Gal in einen unlöslichen blauen Farbstoff umgewandelt wird. Die Intensität der Blaufärbung ist ein guter Indikator für das Fehlen bzw. Vorhandensein einer DNA-Insertion im Polylinker:

a) Dunkelblaue Koloniefärbung zeigen nur Vektoren ohne cDNA-Insertion.

Tab.9:

Anzahl der Kolonien pro Platte nach Transfektion von pUC 18-Vektoren in E. coli.

In (+) wurde der Vektor pUC 18 mit HAV-cDNA ligiert, in (-) wurde der Vektor ohne cDNA ligiert (in Klammern die Gesamtkoloniezahl).

Eine Positivkontrolle (kovalent geschlossener pUC 18-Vektor ohne cDNA-Insertion) resultierte in annähernd 100 % dunkelblauen Kolonien.

Koloniefarbe:	weiß	hellblau	dunkelblau	
(+)	6	25	3	(34)
(-)	12	3	15	(30)

b) Weiße Kolonien werden beobachtet, wenn durch eine cDNA-Insertion das Leseraster der Proteinsynthese im lac z'-Gen zerstört wird.

c) Hellblaue Koloniefärbung deutet auf Insertionen hin, die unter Erhaltung des Leserasters an beiden Nahtstellen einrekombiniert wurden, sodaß ein lac z'-Fusionsprotein gebildet wird, das vermutlich auf Grund einer verminderten Stabilität in der Zelle nur geringe Komplementationsfähigkeit besitzt.

Die Zahlen der Tab.9 (74 % hellblaue Kolonien im Vergleich zu 10 % im Kontrolllexperiment) zeigen, daß nach Einrekombination des HAV-cDNA-Fragments in pUC 18 an beiden Nahtstellen der Ligation (BamHI, PSTI) das Leseraster der Proteinsynthese erhalten bleibt (vorausgesetzt, daß interne Initiation der Proteinsynthese keine Rolle spielt).

Durch Analyse der Restriktionsenzym-Fragmente konnte gezeigt werden, daß nur die hellblauen Kolonien (s. Tab.9) einen Vektor mit einrekombinierter HAV-cDNA (0.5

Kbp) beherbergten (ohne Abb.). Alle Versuche, das VP1-lac z'-Fusionsprotein in direkt nachweisbaren Mengen zu exprimieren, blieben ohne Erfolg: Weder in Coomassie-gefärbten Gelen noch im "Westernblot"-Verfahren (mit antiHAV-positivem Kaninchenserum; vgl. 3.2.25. und 4.2.5.4.1.) konnte ein durch IPTG induzierbares Protein entdeckt werden. Es war daher notwendig, die cDNA-Insertion auf einen anderen Vektor zu übertragen (vgl. 4.2.4.1.).

4.2.3.2. Leseraster in der Nukleotidsequenz eines unabhängigen HAV-Isolats

Linemeyer et al. (1985) konnten durch Proteinsequenzierung die Spaltstelle zwischen VP3 und VP1 lokalisieren und kamen zu dem Ergebnis, daß der N-Terminus von VP1 etwa 5.25 Kb vom 3'-Ende des Genoms liegt. Um das aminoterminal Ende von HAV-VP1 zu exprimieren, mußte daher eine geeignete Restriktionsspaltstelle in diesem Bereich gefunden werden. In der von Linemeyer et al. (1985) bestimmten Nukleotidsequenz des HAV-Stammes CR. 326 findet sich bei Kb 5.60 eine Bgl II-Erkennungssequenz, die auch in der Sequenz des MBB-Stammes auftritt und deren Kombination mit der BamHI-Stelle im Vektor pUC 18 das Leseraster der Proteinsynthese des Stammes CR.326 nicht zerstört. In der Annahme, daß die Bgl II-Sequenz des MBB-Isolats keine Rasterverschiebung erfahren hat, wurde diese Bgl II-Erkennungsstelle und die BamHI-Stelle (Position 4.95 Kb) zur Expression verschiedener cDNA-Fragmente aus dem Bereich des VP1-Gens benutzt.

4.2.4. Konstruktion von Vektoren zur Synthese von HAV-VP1 als Fusionsprotein mit β -Galaktosidase

4.2.4.1. Aufbau von 5 Expressionsvektoren aus cDNA-Restriktionsenzym-Fragmenten

Da die lac z'-Fusion in der Zelle offenbar sehr instabil und nicht leicht nachweisbar ist, wurde nun ein anderes Vektorsystem gewählt: Vektor pUR 290 (Gabe von M. Motz) besitzt neben einem Gen für Ampicillinresistenz ein vollständiges β -Galaktosidasegen (einschließlich Promotor und Operator), das in der Nähe des Carboxyterminus durch einen Polylinker unterbrochen ist. Der Polylinker besitzt eine BamHI- und PSTI-Restriktionsspaltstelle im gleichen Proteinsyntheseraster wie pUC 18, sodaß alle cDNA-Fragmente, die an der Bgl II-Schnittstelle (Position 5.60 Kb) bzw. der BamHI-Stelle (Position 4.95 Kb) beginnen, in pUR 290 exprimiert werden. Unter Einbeziehung dieser Restriktionsenzymspaltstellen wurden 5 Expressionsvektoren konstruiert, deren Aufbau in Abb.19 erläutert wird. Abb.20 vergleicht die Kartenpositionen der cDNA-Insertionen der pUR 290-Vektoren.

Ausgehend von Vektor pUR 290 (BamHI/PSTI-gespalten) und den Klonen 8101 (3'-terminales BamHI-Fragment) und 8096 (3'-terminales Bgl II-Fragment) wurden zunächst die Vektoren 290-5 und 290-17 konstruiert. Dabei ist zu beachten, daß die in Vektor 290-17 entstandene BamHI/Bgl II-Hybridkennungssequenz von keinem der beiden Enzyme gespalten werden kann, sodaß die in der von Klon 8096 stammenden cDNA vorhandene BamHI-Stelle für weitere Umgestaltungen des Vektors zur

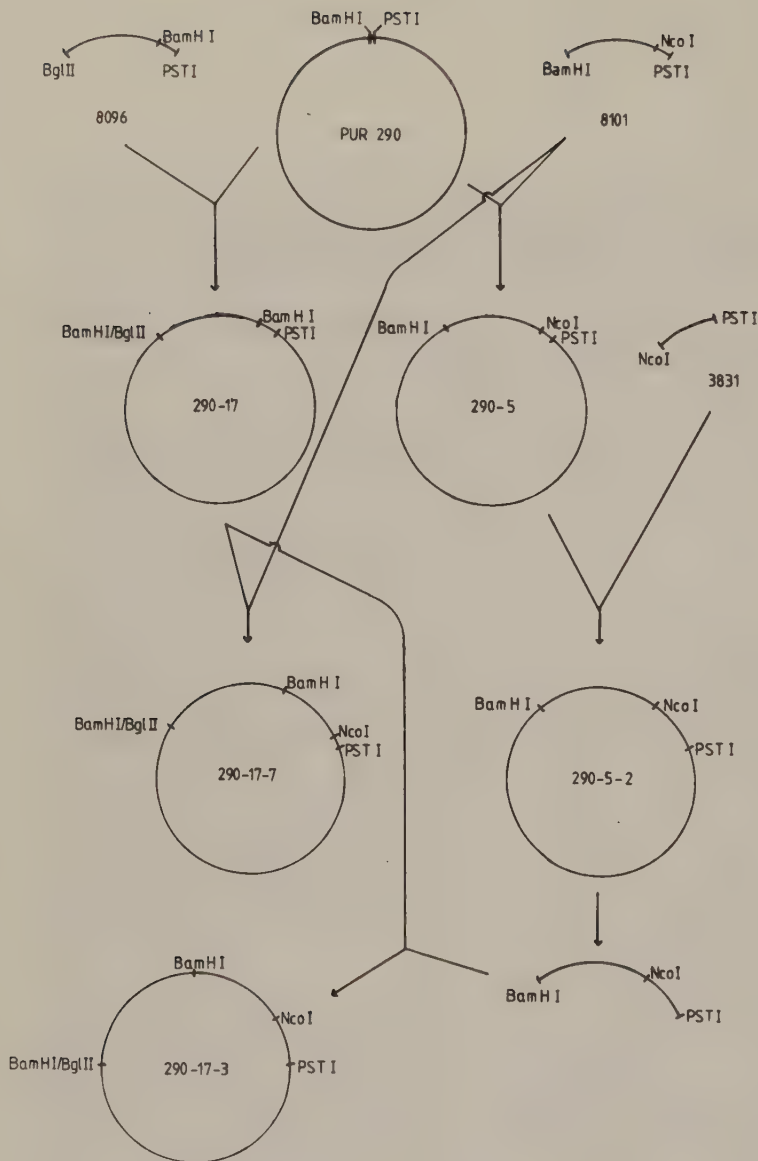


Abb. 19:

Aufbauschema der von pUR290 abgeleiteten Expressionsvektor-Konstruktionen (siehe Text).

Verfügung stand. Auch die NcoI-Spaltstelle im HAV-cDNA-Bereich des Vektors 290-5 konnte zur Erweiterung des Plasmids benutzt werden, da pUR 290 keine NcoI-Spaltstelle besitzt.

Vektor 290-17-7 wurde durch Erweiterung von 290-17 (BamHI/PSTI-gespalten) mit dem 3'-Fragment des BamHI-gespaltenen Klons 8101 und Vektor 290-5-2 durch Erweiterung des NcoI/PSTI-gespaltenen Plasmids 290-5 mit dem 0.5 Kbp-Fragment des NcoI/PSTI-verdauten kleinsten PSTI-Fragmentes des Klons 3831 erzeugt.

Vektor 290-17-3 schließlich ist aus dem BamHI/PSTI-gespaltenen Vektor 290-17 und aus der von Vektor 290-5-2 mit BamHI/PSTI isolierten Insertion zusammengesetzt.

Anmerkung:

Im Folgenden werden die Bezeichnungen der Expressionsvektoren auch für die entsprechenden Klone verwendet.

4.2.4.2. Analyse des cDNA-Anteils der Expressionsvektoren nach Isolation aus den transformierten E. coli-Zellen

Alle Vektoren wurden in E. coli JM 109 transfektiert (vgl. 3.2.13.) und ihre Zusammensetzung durch Restriktionsenzym-Analyse (z.T. Doppelspaltungen; vgl. 4.1.6.2.) überprüft. Vektor 290-17-3 zeigte folgendes Spaltmuster: Eine NcoI/PSTI-Spaltung erzeugte die erwarteten Fragmente von ca. 0.5 und 0.7 Kbp; nach PSTI-Verdau findet man den linearisierten Vektor, aber kein weiteres DNA-Fragment. Mehrfachinsertionen von cDNA sind daher ausgeschlossen. Die 5'-Enden aller cDNA-Insertionen und die 3'-Enden der Insertionen in den

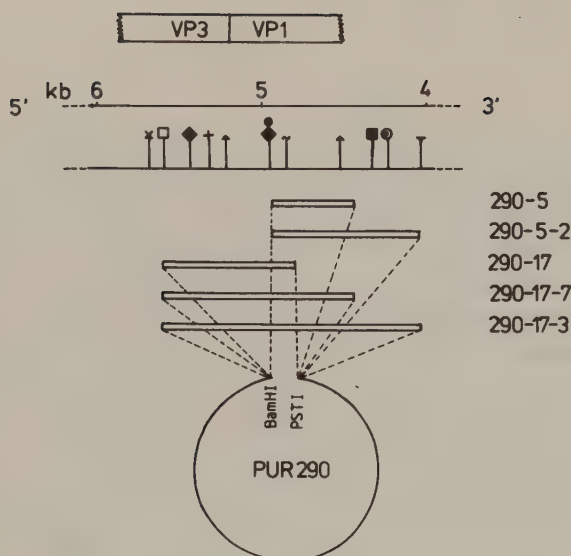


Abb. 20:

Kartenposition der cDNA-Insertionen der von pUR290 abgeleiteten Expressionsvektoren. Die Restriktionskarte ist der Abb. 17 entnommen. Die Lage der VP1-VP3-Grenze wurde von Linemeyer et al. (1985) übernommen.

⋈ = HinfI; □ = Bgl II; ◆ = HincII; ↑ = HindIII;

↑ = NcoI; ↓ = BamHI; T = NdeI; ◼ = EcoRI;

○ = PvuII; T = PstI.

Vektoren 290-5-2 und 290-17-3 sind von natürlichen Restriktionsspaltstellen begrenzt. Dagegen sollten die 3'-Enden der cDNA-Insertionen von 290-5, 290-17 und 290-17-7 kurze (dC)-Homopolymere von 25-30 Bp enthalten.

Das Molekulargewicht von HAV-VP1 beträgt maximal etwa

33 Kd (entsprechend einer Länge des Gens von 900 Bp). Das carboxyterminale Ende von VP1 sollte nach dieser Kalkulation etwa mit der EcoRI-Erkennungsstelle (Position 4.35 Kb) zusammenfallen.

4.2.5. SDS-PAGE und "Westernblot" von Gesamtzellprotein plasmidtragender E. coli-Zellen

4.2.5.1. SDS-PAGE

Die plasmidtragenden Bakterien wurden vor bzw. nach Induktion mit IPTG (vgl. 3.2.22.2.) lysiert und das zelluläre Gesamtprotein durch SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. 3.2.23.). Wegen der beträchtlichen Größe der Proteine (MG der β -Galaktosidase: 116 Kd) betrug die Acrylamidkonzentration in allen Gelen 8%. Die Proteine wurden entweder mit Coomassie-Blau angefärbt oder elektrophoretisch auf Nitrozellulosefilter übertragen ("Blot") und dann mit antiHAV-positivem Human- oder Kaninchenserum getestet ("Westernblot", s. 4.2.5.4.).

4.2.5.2. Identifizierung der β -Galaktosidase-Fusionsproteine

Die Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten und mit Coomassie gefärbten Proteine ergab folgendes Bild: Die 5 Expressionsvektoren exprimierten Fusionsproteine, die 1.) in der Negativkontrolle (Vektor ohne cDNA-Insertion) fehlen und 2.) durch IPTG induziert werden und größer als die β -Galaktosidase selbst sind. Zudem korrespondieren die Molekulargewichte der induzierten Fusionsproteine etwa mit den Längen der cDNA-Inser-

tionen der Vektoren (290-17-3 > 290-17-7 > 290-5-2 > 290-17 > 290-5), sodaß diese Proteine mit Sicherheit mit der β -Galaktosidase fusioniert sind (Abb.21).

Neben den Fusionsproteinen, deren Molekulargewicht der Summe der Molekulargewichte der β -Galaktosidase und des errechneten HAV-VP1-Anteils entspricht, treten häufig noch andere Produkte auf, die ebenfalls wichtige Kriterien eines β -Galaktosidase-Fusionsproteins erfüllen (Induzierbarkeit durch IPTG, Fehlen in der Negativkontrolle, größer als β -Galaktosidase). Diese Produkte sind entweder durch vorzeitigen Kettenabbruch der Proteinsynthese oder "post translationem" durch Proteaseeinwirkung entstanden (vgl. Abb.21 bis 23).

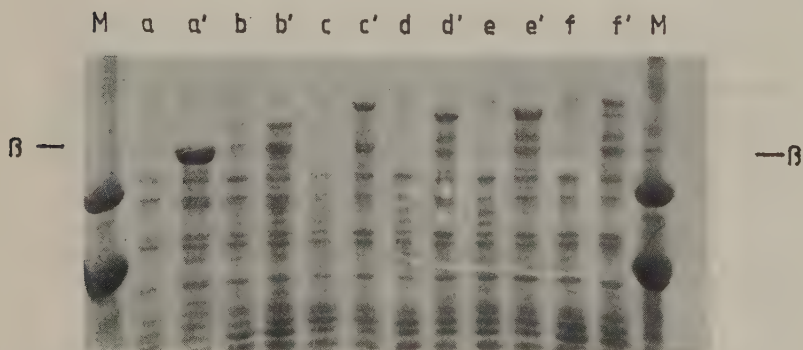


Abb.21:

Protein-PAGE und Coomassie-Färbung von *E. coli*-Gesamtprotein. M = Molekulargewichts-Marker (vgl. 3.2.23.). Vektoren: Spuren (a)/(a') = pUR 290; Spuren (b)/(b') = 290-5; Spuren (c)/(c') = 290-5-2; Spuren (d)/(d') = 290-2 (isogenisch mit 290-17); Spuren (e)/(e') = 290-17; Spuren (f)/(f') = 290-17-7; Spuren (a) bis (f) = uninduziert; Spuren (a') bis (f') = 1.5h mit IPTG induziert; β = β -Galaktosidase.

Pro Geltasche wurden 20 μ l der jeweiligen Proteinlösung aufgetragen (vgl. 3.2.22.2.).

4.2.5.3. Vorläufige Bestimmung des Molekulargewichts eines β -Galaktosidase-Fusionsproteins

Das Molekulargewicht der Proteine konnte an Hand der verwendeten Molekulargewichts-Marker (max. 116 Kd) nicht exakt bestimmt werden, da die Gelaufentrennung im oberen MG-Bereich nicht mehr linear verläuft. Zur vorläufigen Bestimmung des Molekulargewichts des in Abb.22A mit * bezeichneten Proteins des Klons 290-17-7 (auch die Klone 290-17 und 290-2 synthetisieren ein Protein gleichen Molekulargewichts; Abb.21) wurden den jeweils größten Fusionsproteinen der Klone 290-5, 290-5-2 und 290-17-7 und der β -Galaktosidase R_f -Werte von 3.7, 3.3, 3.2, und 4.25 zugeordnet. Die R_f -Werte wurden halblogarithmisch gegen das rechnerisch sich ergebende Molekulargewicht der reifen Fusionsproteine aufgetragen. Der R_f -Wert des unreifen Fusionsproteins beträgt 3.9 und korrespondiert in der ermittelten Gerade mit einem Molekulargewicht von 126 Kd. Unter der Voraussetzung, daß dieses Protein im Aminoterminus mit β -Galaktosidase übereinstimmt, kann nun der Fremdproteinanteil zu 10 Kd und der diesem Proteinanteil entsprechende cDNA-Bereich zu ca. 300 Bp bestimmt werden. Wie in Abschnitt 4.2.5.4.2. gezeigt wird, bindet dieses Fusionsprotein im "Westernblot"-Experiment keine Antikörper aus dem verwendeten antiHAV-positiven Kaninchen-serum.

4.2.5.4. "Westernblot" filtergebundener Proteine

4.2.5.4.1. Die verwendeten Seren

Filtergebundenes bakterielles Gesamtprotein wurde mit folgenden Seren (Gabe von V. Gauß-Müller) inkubiert (s. 3.2.25.2.):

- a) antiHAV-positives humanes Rekonvaleszenten-Serum.
- b) antiHAV-negatives Präimmunserum aus dem Kaninchen.
- c) antiHAV-positives Kaninchenserum.

Wichtige Eigenschaften des letztgenannten Serums:

In einer Verdünnung von 1:50 reagiert das Serum im Protein-"dot-blot" mit nativem und denaturiertem Hepatitis A-Antigen (HAAg aus gereinigten Viruspartikeln gewonnen), sowie im "Westernblot"-Verfahren mit den aus Partikeln gereinigten viralen Proteinen p33 (VP1) und p27 (VP2). (Nach V. Gauß-Müller, in "Hepatitis Viruses and Hepatocellular Carcinoma: Approaches through Molecular Biology and Ecology", Academic Press; in Vorbereitung).

4.2.5.4.2. Ergebnisse der "Westernblot"-Experimente

Die Inkubation filtergebundener Proteine mit den in 4.2.5.4.1. genannten Seren (vgl. 3.2.25.) erbrachte folgende Ergebnisse:

- a) AntiHAV-positives humanes Rekonvaleszenten-Serum reagierte nicht mit den in 4.2.5.2. beschriebenen β -Galaktosidase:HAV-VP1-Fusionsproteinen (ohne Abb.).
- b) Präimmunserum vom Kaninchen reagierte nicht (ohne Abb.).

c) AntiHAV-positives Kaninchenserum reagierte wie folgt (vergl. Abb.22 und 23; die Klone 290-5 und 290-17 ohne Abb.):

pUR	290	290	290	290	290	290	(Vektor-
		-5	-5-2	-17	-17-7	-17-3	konstrukt)
	-	-	-	+	+	+	(Reaktion im
							"Westernblot")

Die unter den Versuchsbedingungen nachweisbare Antikörperbindungsstelle muß demnach zwischen der Bgl II- (Position 5.60 Kb) und der BamHI-Restriktionsspaltstelle (Position 4.95 Kb) des HAV-Genoms lokalisiert sein.

Ein in Abb.22 mit * gekennzeichnetes Protein (von den Klonen 290-17 und 290-17-7 synthetisiert) mit einem Molekulargewicht von ca. 126 Kd, das vermutlich vom β -Galaktosidasegen und vom 5'-Ende der HAV-cDNA-Insertion (ca. 0.3 Kbp; s. 4.2.5.3.) abgelesen wird, reagiert nicht mit antiHAV-positivem Kaninchenserum und enthält daher keine von diesem Serum erkannte Antikörperbindungsstelle. Die VP3/VP1-Grenze liegt etwa 0.35 Kb von der Bgl II-Stelle (5.60 Kb) bei Kb 5.25. Die Antikörperbindungsstelle muß daher zwischen Kb 4.95 und Kb 5.30 liegen, also am Aminoterminus von VP1 (oder am äußersten Carboxyterminus von VP3; s. Diskussion). Aus Expressionsklon 290-17-7 isoliertes Gesamtprotein enthielt in zwei verschiedenen Experimenten 2 (Abb.22) bzw. 4 (Abb.23) mit antiHAV-positivem Kaninchenserum reagierende Fusionsproteine. Diese Proteine waren aus-

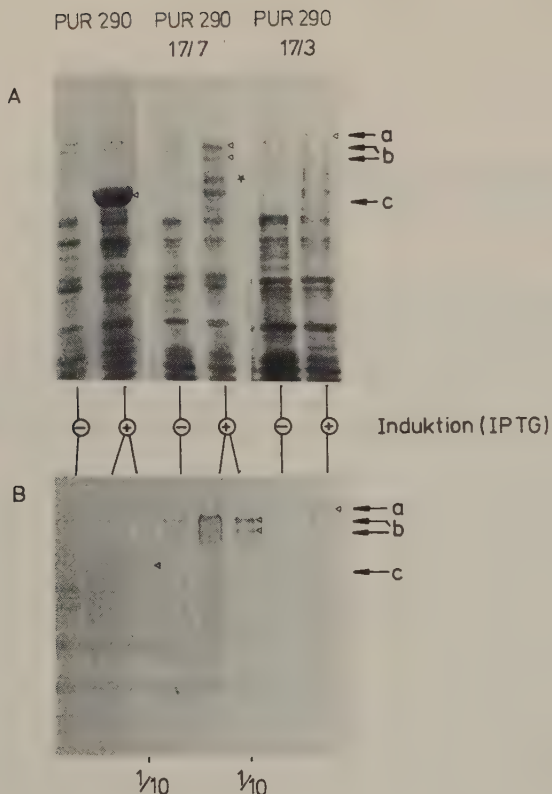


Abb.22:

Vergleich der von den Klonen 290, 290-17-7 und 290-17-3 synthetisierten Proteine.

PAGE und Coomassie-Färbung (A) bzw. "Westernblot" und anschließende Inkubation mit antiHAV-positivem Kaninchenserum (B) von *E. coli*-Gesamtprotein. Pro Geltasche wurden 20 μ l bzw. 2 μ l (bei den 1/10-Verdünnungen) der entsprechenden Proteinlösung aufgetragen (3.2.22.2.).

(-) = uninduziert; (+) = 1.5h induziert; (a) = größtes Fusionsprotein d. Klons 290-17-3; (b) = die 2 größten Fusionsproteine d. Klons 290-17-7; (c) = β -Galaktosidase (pUR290); (1/10) = 1/10-Verdünnung der Proteine induzierter Bakterien. Pfeile bezeichnen in (A) und (B) im Molekulargewicht übereinstimmende Proteine. Zum mit * gekennzeichneten Protein vgl. 4.2.5.3. und 4.2.5.4.

nahmslos größer als das in Abb.22A mit * markierte Produkt und sind vermutlich durch vorzeitige Termination der Translation (oder "post translationem" durch unspezifisches "Processing") gebildet worden. Klon 290-17-3 zeigt nach Induktion mit IPTG viele mit antiHAV-positivem Kaninchenserum reagierende Proteine, die zum Teil kleiner als die β -Galaktosidase sind und daher vermutlich durch sekundäre Spaltung des β -Galaktosidaseanteils des Fusionsproteins entstanden sind (Abb. 22B).

Das antiHAV-positive Kaninchenserum reagiert nicht nur mit den HAV-VP1: β -Gal.-Fusionsproteinen; auch viele (nicht durch IPTG induzierte) bakterielle Proteine binden Antikörper aus diesem Serum (vgl. Abb.22 und Abb.23). Diese Antikörperbindung könnte durch unspezifische Reaktion der Antikörper mit dem denaturierten Bakterienprotein bedingt sein. Aber auch eine immunologische Kreuzreaktion der Nitrozellulose-filtergebundenen Bakterienproteine mit dem bakteriellen Material, das als Immunisationshilfe eingesetzt wurde (Freund-Adjuvans; vgl. 3.2.25.2.), kann nicht ausgeschlossen werden.

4.2.6. Radioimmuno-Assay (RIA)

Das Gesamtzellprotein der Klone 290-5, 290-5-2, 290-17, 290-17-7 und 290-17-3 wurde präpariert (vgl.3.2.26.) und in einem RIA (3.2.27.) auf eine Reaktion mit Antikörpern aus einem antiHAV-positiven Humanserum getestet. Keine der Proteinpräparationen reagierte mit HAV-spezifischen Antikörpern.

Durch Zentrifugation von Aliquots der im RIA einge-

setzten Proteinpräparationen und anschließender SDS-Gelelektrophorese und "Westernblot" des Pellets und des Überstands (3.2.26.) wurde gezeigt, daß die untersuchten Fusionsproteine praktisch unlöslich sind: Die im "Westernblot" reaktiven Polypeptide waren hauptsächlich im Pellet zu finden (ohne Abb.; s. Diskussion).

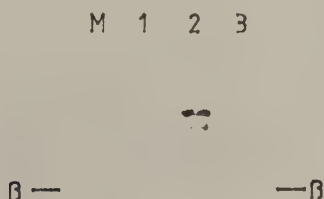


Abb. 23:

Vergleich der von den Klonen 290-17-7 und 290-5-2 synthetisierten Proteine. "Westernblot" und anschließende Inkubation mit antiHAV-positivem Kaninchenserum nach SDS-PAGE von E. coli-Gesamtprotein. M = Molekulargewichtsstandard (vgl. 3.2.23.); Vektoren: Spuren (1) und (2) = 290-17-7; Spur (3) = 290-5-2; Spur (1) = uninduziert; Spur (2) und (3) = 1.5h mit IPTG induziert; β = β -Galaktosidase. Pro Gelflasche wurden 2 μ l der jeweiligen Proteinlösung aufgetragen (3.2.22.2.).

5. ANMERKUNGEN ZU PROBLEMEN DER cDNA-SYNTHESE UND KARTIERUNG VON cDNA-KLONEN

Die Homopolymertermini, die an den Übergängen von der cDNA-Insertion zum Vektor vor den PSTI-Erkennungsstellen liegen, können zu mißverständlichen Kartierungsergebnissen führen, wenn sie in der Größenbestimmung von Restriktionsenzym-Fragmenten nicht berücksichtigt (subtrahiert) werden.

Aus Tab.5 und Abb.15 geht hervor, daß Klon 3831 auf der dem Genom-3'-Ende zugewandten Seite der authentischen PSTI-Erkennungsstelle an Position 4.05 Kb eine HinfI-Stelle im Abstand von ca. 0.05 Kb und eine AvaII-Erkennungssequenz in einer Entfernung von ca. 0.15 Kb besitzt. Klon 5980 der ebenfalls in dieser Region kartiert, wird von HinfI und AvaII jeweils in ein 30 - 50 Bp größeres Fragment gespalten, sodaß zunächst vermutet wurde, dieser Klon überstreiche den Bereich der PSTI-Stelle, habe diese aber verloren. Wahrscheinlicher ist hingegen die Situation, wie sie das folgende Schema verdeutlicht:

AvaII	HinfI	PSTI(4.05 Kb)	
+	+	+	3831
+	+	xxxxxx	5980

(xxx = dC - Homopolymer)

Die dC-Homopolymere dürften auch dafür verantwortlich sein, daß die Klone 7948 und 6115, obschon in einem

Bereich von ca. 50 Bp überlappend, nicht miteinander hybridisieren (Abb.15; Tab.3) und daß die Klone 8425, 8519 und 9451 den Klon 8476, dessen 3'-terminales PSTI-Fragment in der Synthese dieser Klone als Primer diente, am 3'-Ende um 20-25 Bp überragen (Abb.16).

Klon 7131 enthält am 3'-Ende mehrere 100 Bp, die in Hybridisierungsexperimenten nicht identifiziert werden konnten (s. Abb.15). Da Klon 7131 die HaeIII-Stelle (Position 2.85 Kb) und die HinfI-Stelle (Position 2.75 Kb), nicht aber die PSTI-Erkennungsstelle (Position 2.4 Kb) besitzt, muß die Nahtstelle zwischen den authentischen HAV-cDNA-Bereichen und unspezifischen Bereichen zwischen den genannten PSTI- und HinfI-Spaltstellen liegen. Ob Fehler der reversen Transkription oder sekundäre Ereignisse für das Zustandekommen dieses cDNA-Klons verantwortlich sind, ist nicht bekannt. Ein Einfluß der Primär- oder Sekundärstruktur der RNA in diesem Bereich kann jedoch weitgehend ausgeschlossen werden, da 4 weitere Klone den fraglichen Genombereich überstreichen und zu identischen Restriktionsmustern führen.

Ein Klon konnte auf Grund der Hybridisierungsdaten nicht eindeutig kartiert werden: Klon 2014, obschon nur 0.55 Kbp lang, hybridisiert mit den Klonen 1998 und mit dem 1.7 Kbp-Fragment, das durch PSTI aus Klon 3831 erzeugt wird (Tab.3), also mit mehr als 0.9 Kb ent-

fernten und überdies durch 2 authentische PSTI-Stellen getrennten Genombereichen. Die Ursachen, die zur Entstehung dieses Klons führten, sind nicht bekannt; es wäre aber denkbar, daß die R.T. an einer ausgeprägten Sekundärstruktur der RNA in seltenen Fällen diese Struktur überspringt oder aber im Laufe der Plasmidreplikation in E.coli der Mittelteil eines ursprünglich lückenlosen Klons deletiert wurde.

6. DISKUSSION

6.1. Reverse Transkription von HAV-RNA, Klonierung und physikalische Kartierung der cDNA

HAV-RNA wurde aus gereinigten HAV-Partikeln gewonnen, die in Alexanderzellen (PLC/PRF/5) kultiviert wurden. Das Inokulum wurde aus dem Stuhl eines wahrscheinlich in Marokko an Hepatitis A erkrankten Mitteleuropäers gewonnen (Bezeichnung des Isolates: MBB). Die cDNA-Klone wurden auf ihre Spezifität hin überprüft. Hybridisierungsdaten und die Analyse von Restriktionsenzym-Fragmenten führten zur Erstellung einer kompletten Restriktionskarte.

Zunächst wurde mit einer Gewichtsausbeute von 25-30% (bezogen auf die HAV-RNA) in Gegenwart des "Primers" oligo-(dT) eine cDNA-Synthese durchgeführt. Die daraus hervorgegangenen Klone wurden z.T. durch Hybridisierung gegen die Produkte einer erneuten, aber unter etwas veränderten Bedingungen durchgeführten, oligo (dT)-geprägten cDNA-Synthese kartiert. Diesem Vorgehen lag die Annahme zugrunde, daß oligo (dT) vor allem an den poly (A)-Strang am 3'-Ende der HAV-RNA hybridisiert und daher die meisten Moleküle der ss-cDNA an diesem Ende beginnen. In einer oligo(dT)-geprägten cDNA-Synthese entsteht demnach eine Population von Molekülen, die auf Grund einer gewissen Wahrscheinlichkeit des vorzeitigen Kettenabbruchs während der reversen Transkription 3'-ferne Genom-Bereiche seltener beinhaltet als 3'-nahe Bereiche. In einem Kontrollexperiment, in dem die Synthese der ss-cDNA von einem Zufalls-"Primer" geprägt wurde, wurden vermutlich alle

Genombereiche mit gleicher Wahrscheinlichkeit abgedeckt. Durch Hybridisierung mit beiden cDNA-Präparationen konnten Klone grob kartiert und einige Klone als "3'-fern" eingestuft werden. Die spätere Feinkartierung der untersuchten "3'-fernen" Klone bestätigte die Ergebnisse der Grobkartierung und zeigte, daß ein nachweisbarer Teil der zur Grobkartierung benützten, von oligo(dT) geprägten ss-cDNA-Molekülpopulation die Region von 3.500-4000 Basen überstreicht und nur ein sehr geringer Prozentsatz der Moleküle länger als 5.500 Basen ist.

Vermutlich sind Sekundärstrukturen der HAV-RNA für den vorzeitigen Kettenabbruch während der reversen Transkription verantwortlich. Mit dieser Annahme steht die Beobachtung von diskreten Banden nach Gelauf-trennung der Syntheseprodukte einer cDNA-Synthese nach der "primer-extension"-Methode prinzipiell in Einklang: Jede Bande dürfte einem Kettenabbruch durch eine Sekun-därstruktur entsprechen, an der die R.T. mit erhöhter Wahrscheinlichkeit die Synthese abbricht. In den oligo(dT)-geprägten Synthesen konnte dieses Phänomen nicht gezeigt werden: vermutlich hybridisiert oligo(dT) an den verschiedensten Stellen des poly(A)-Trakts der RNA, sodaß die 5'-Enden der resultierenden cDNA-Mole-küle nicht exakt übereinstimmen.

Die 5'-Enden der von einem Zufalls-"Primer" geprägten ss-cDNA-Moleküle kartieren wahrscheinlich an beliebigen Stellen des HAV-Genoms. Die 5'-Enden der von oligo(dT) geprägten ss-cDNA-Moleküle sind dagegen meistens kom-plementär zu einem Teil des poly(A)-Trakts am 3'-Ende der HAV-RNA. Das wird auch durch ein sehr seltenes Vorkommen von "3'-fernen" Klonen nach oligo(dT)-gepräg-

ten präparativen cDNA-Synthesen belegt. Im Gegensatz hierzu berichteten Linemeyer et al., (1985) von unspezifischer Initiierung durch oligo(dT) und darüberhinaus von einer Initiation ohne "Primer".

Die Beobachtung, daß nur ein kleiner Teil der Klone tatsächlich die 3'-poly(A)-Region der HAV-RNA repräsentiert, ist unerwartet, da die Moleküle der von oligo(dT) geprägten ss-cDNA an ihren 5'-Enden meist komplementär zur poly(A)-Region der viralen RNA sind (s.o.). Das deutet darauf hin, daß während der Synthese von ds-cDNA interne Einzelstrangbrüche der cDNA-Moleküle von der terminalen Transferase als Substrat benutzt werden können (Küpper et al., 1981). Die doppelsträngigen cDNA-Moleküle hybridisieren also über endständige und interne (dC)-Homopolymerstränge an das Plasmid, wodurch aus einem cDNA-Molekül mehrere verschieden lange Plasmide hervorgehen können. Daher enthalten die rekombinanten Plasmide häufig nicht das 3'-Ende des ds-cDNA-Moleküls, das in den Vektor eingebaut wurde. Neben diesem Mechanismus ist auch eine Beteiligung der S1-Nuklease denkbar: S1-Nuklease kann an Einzelstrangbrüchen Doppelstrangbrüche erzeugen. Da aber das in Rede stehende Phänomen auch in S1-Nuklease-unabhängigen cDNA-Synthesen beobachtet wurde, scheint dieser Mechanismus nicht zu dominieren.

Drei weitere HAV-Isolate wurden während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit von anderen Arbeitsgruppen kloniert und z.T. sequenziert (Ticehurst et al., 1983; Baroudy et al., 1985; Linemeyer et al., 1985; Najarian et al., 1985). 1981 beschrieben v.d.Helm et al. zum ersten Mal die Herstellung von HAV-spezifischen cDNA-

Klonen, die (wegen zu geringer Größe) nicht molekularbiologisch charakterisiert wurden.

Die Restriktionskarten der cDNA der verschiedenen Isolate wurden mit der des MBB-Isolats verglichen. Die Divergenz der zugrundeliegenden Sequenzen beträgt für jedes Vergleichspaar ungefähr 4%. Der K-Wert (Substitutionen/Nukleotid) beträgt ca. 0,04.

Die Nukleotidsequenzen einiger der in dieser Arbeit beschriebenen Klone werden z.Z. unabhängig von der vorliegenden Arbeit ermittelt.

Bei Abschluß dieser Arbeit lagen erste Daten über die Sequenzen der Klone 6115/6401 und 2470 vor (Wimmer, Ostermayr, von der Helm; unveröffentlicht). Die Nukleotidsequenzen unserer cDNA-Klone stimmen in hohem Maß mit den cDNA-Sequenzen aller anderen HAV-Isolate überein, was die Authentizität unserer cDNA-Klone beweist. Die Nukleotidsequenzen wurden abzüglich der 53 (Klon 2470) bzw. 93 (Klon 6115/6401) 3'-terminalen Nukleotide mit Virusisolat CRL-LA (Klon 6115/6401) bzw. CR-326 (Klon 2470) verglichen. Für das Klonpaar 6115/6401 ergibt sich eine Divergenz von 10% (Nukleotidsequenz) bzw. 2% (Aminosäuresequenz). Die entsprechenden Werte für Klon 2470 errechnen sich zu 8% (Nukleotidsequenz) und 0.4% (Aminosäuresequenz). Die beobachteten Nukleotidaustausche führen nur in einem Fall zum Austausch einer Aminosäure, der zudem konservativ ist (THR-SER). Die meisten der Aminosäureaustausche treten in Codonposition 3 auf. Das bedeutet, daß auf Grund der Degeneration des genetischen Codes die meisten Nukleotidaustausche nicht zu einem Aminosäureaustausch führen. Die CpG-Häufigkeit der sequenzierten cDNA liegt mit 1.2% weit unter dem statistisch zu erwartenden Wert von

5.3%, was sich auch in der Codonauswahl widerspiegelt.

Die Ursache für die Diskrepanz der Divergenzwerte auf Nukleotidniveau, die sich aus den Sequenzierungsdaten bzw. den Daten der Restriktionsenzym-Analyse errechnen, dürften darin zu suchen sein, daß im letzteren Fall nur wenige sehr kleine DNA-Abschnitte (die Erkennungsstellen der Endonukleasen) analysiert werden und das Signifikanzniveau dieser Berechnung dementsprechend niedrig ist. Erst weitere Sequenzierungsdaten werden Aufschluß über die Homologiebeziehungen verschiedener HAV-Isolate geben können. Der hohe Grad der Übereinstimmung verschiedener HAV-Isolate (Europa, Australien, USA) steht in Einklang mit den serologischen Eigenschaften von HAV (nur 1 Serotyp).

Wie schon erwähnt, konnte ein poly(A)-Bereich am 3'-Ende des HAV-Genoms durch Hybridisierung nachgewiesen werden, die Genomlänge errechnete sich zu 7.500 Basen und das natürliche 5'-Ende des HAV-Genoms ist vermutlich in der erstellten Restriktionskarte enthalten. Die durch Analyse von Restriktionsenzym-Fragmenten ermittelte Gesamtlänge des HAV-Genoms kann auf Grund von Unsicherheiten in der Abschätzung von Fragmentlängen vermutlich noch um bis zu 2% vom tatsächlichen Wert abweichen; erst die Ermittlung der Nukleotidsequenz des Virusisolates wird zu einer exakten Bestimmung der Genomlänge führen. Darüberhinaus gibt es keine Hinweise auf das Vorhandensein eines poly(C)-Segments, das im Aphthovirensystem die Klonierung des 5'-Bereiches des Genoms erschwert hat (Forss et al., 1984).

6.2. Expression von HAV-cDNA in E. coli

Der 2. Teil der vorliegenden Arbeit befaßt sich mit der Synthese eines HAV-Capsidproteins als Teil eines Fusionsproteins in E. coli. Da HAV-Partikel nicht glykosyliert sind (Putnak a. Phillips, 1981), wurde E.coli (das kein den Eukaryonten vergleichbares Glykosylierungssystem besitzt; Harris, 1983; S. 130 f) als Wirtsorganismus gewählt. Protein VP1 spielt, wie im Teil "Biologie und Biochemie der Picornaviren" kurz erläutert, vermutlich eine herausragende Rolle bei der Neutralisation von HAV, da es offensichtlich einen bedeutenden Teil der Partikeloberfläche besetzt (Gerlich a. Frösner, 1983) und wenigstens 1 Antigen besitzt, welches neutralisierende Antikörper induziert, wie durch Quervernetzungsexperimente mit MKA gezeigt wurde (Hughes et al., 1984). Daher beschränkt sich dieser Teil der Arbeit auf die Expression von cDNA des VP1-Gens.

Zunächst wurde ein Restriktionsenzym-Fragment aus dem zentralen Bereich des VP1-Genes in einen pUC-Vektor ligiert, um Informationen über die Transkriptions- und Translationseigenschaften dieses Genomabschnittes in E.coli zu erhalten. pUC-Vektoren nehmen Fremd-DNA nahe dem N-terminalen Ende ihres lac z'-Genes in einem Polylinker auf. Wenn an beiden Nahtstellen der cDNA-Insertion das Leseraster der Proteinsynthese erhalten bleibt, wird ein Fusionsprotein gebildet, das, obwohl selbst enzymatisch inaktiv, in der Lage ist, ein ebenfalls enzymatisch inaktives (chromosomales) Genprodukt

zur enzymatischen Funktion zu komplementieren. Das lac z':VP1-Fusionsprotein war in der Lage, das defekte chromosomale Genprodukt zu komplementieren. Damit waren zwei Punkte geklärt: Das eingesetzte cDNA-Fragment besitzt einen durchgehenden offenen Leserahmen, der an beiden Enden der Insertion nahtlos in das Raster des lac z'-Genes des Vektors pUC 18 paßt.

Anschließend wurde versucht, in E.coli-Zellen, die das pUC 18:HAVcDNA-Konstrukt tragen, das lac z':VP1-Fusionsprotein direkt nachzuweisen. Das Protein konnte aber weder in Coomassie-gefärbten Gelen noch im "Westernblot"-Verfahren nachgewiesen werden. Vermutlich ist das Fusionsprotein in E.coli zu instabil, um mit diesen Nachweismethoden entdeckt zu werden. In E.coli werden Fremdproteine allgemein schneller abgebaut als die meisten zelleigenen Proteine. Durch Fusion mit großen bakteriellen Zellproteinen wie der β -Galaktosidase kann die Stabilität des Fremdproteins in E. coli meist erheblich gesteigert werden (Harris, 1983;S.135 f). Worauf diese Unterschiede in der Stabilität von Proteinen in E. coli beruhen, ist nicht bekannt; es scheinen aber wenigstens 8 verschiedene Proteaseaktivitäten involviert zu sein (Swamy a. Goldberg, 1981).

Die pUC 18- und pUR 290- Vektoren tragen die zum Klonieren geeigneten Restriktionsspaltstellen im gleichen Leseraster. Daher konnte das aus HAV-VP1-cDNA isolierte Restriktionsenzym-Fragment unter Erhaltung des Rasters der Proteinsynthese an den Nahtstellen aus pUC 18 auf pUR 290 übertragen werden. Das pUR 290-HAV-cDNA-Hybridplasmid expriimierte nun ein fusioniertes

Protein, dessen N-Terminus die annähernd vollständige β -Galaktosidase und dessen C-Terminus einen dem HAV-VP1 homologen Proteinabschnitt repräsentiert (Im Vergleich hierzu besitzen die über pUC 18 exprimierte Fusionsproteine nur die 141 N-terminalen der über 1.000 Aminosäuren der β -Galaktosidase). Der hohe β -Galaktosidase-Anteil des Fusionsproteins trägt ausreichend zur Stabilisierung des Proteins bei. Daher konnte das Fusionsprotein in Coomassie-gefärbten Gelen leicht als induzierbares Protein identifiziert werden. Ausgehend von diesem Vektor wurden 4 weitere Vektoren mit unterschiedlichen, z.T. überlappenden, Anteilen von HAV-VP1-cDNA hergestellt.

Alle Vektoren steuerten nach Induktion die Synthese mehrerer relativ stabiler Fusionsproteine, die im Coomassie-gefärbten Gel sichtbar waren. Möglicherweise bricht die Translation (oder die Transkription) an einigen prädestinierten Stellen besonders häufig ab, oder die reifen Fusionsproteine werden sekundär durch bakterielle Proteasen gespalten. Es wäre denkbar, daß Sekundärstrukturen der m-RNA die Ribosomen an einigen Stellen arretieren und nur ein Teil der Ribosomen diese Strukturen passiert, während der andere Teil die Synthese beendet und dissoziiert. Eine Arretierung der Ribosomen ist auch durch eine von E.coli-mRNA abweichende Codon-Häufigkeit des HAV-cDNA-Anteils der Fusions-mRNA denkbar, da nicht alle t-RNA-Spezies in E.coli in gleichem Maße zur Verfügung stehen. Wenn eine derartige Arretierung nicht zum vorzeitigen Kettenabbruch in der Proteinsynthese führt, dann sollte man zumindest einen Einfluß auf die Syntheserate des Fusionsproteins feststellen können. Ein Einfluß der

Codon-Häufigkeit in einer mRNA auf die Proteinsyntheserate in *E. coli* konnte experimentell nachgewiesen werden (Robinson et al., 1984). Es überrascht daher nicht, daß auch die vorliegenden Resultate eindeutig eine Reduzierung der Ableserate der fusionierten mRNA anzeigen. Beide Mechanismen scheinen also in die Synthese der β -Galaktosidase:HAV-VP1-Fusionsproteine involviert zu sein: Zum einen werden die Ribosomen nach Durchlaufen des β -Galaktosidase-Gens im VP1-Gen-Anteil der mRNA an Sekundärstrukturen oder an in *E. coli* selten benützten Codonen angehalten; es resultiert eine Reduzierung der Translationsgeschwindigkeit. Zum anderen dissoziiert in Folge der verlängerten Verweildauer an den Sekundärstrukturen bzw. seltenen Codonen der mRNA ein Teil der Ribosomen an diesen Strukturen; neben den Proteinen voller Länge entstehen daher unvollständige Fusionsproteine. Aber auch ein vorzeitiges Abspringen der RNA-Polymerase auf Grund von Sekundärstrukturen der gebildeten mRNA, wie es für die Regulation des Tryptophanoperons in *E. coli* postuliert wurde (Yanofsky, 1981), kann nicht ausgeschlossen werden.

Das diskutierte Modell geht davon aus, daß verkürzte Fusionsproteine durch Kettenabbruch während der Translation (oder der Transkription) entstehen und daher aus dem vollständigen β -Gal.-Molekül mit unterschiedlichen HAV-VP1-Anteilen bestehen sollten.

Es wäre aber ebenso denkbar, daß der HAV-spezifische Anteil der reifen Fusionsproteine an einigen Stellen bevorzugt von bakteriellen Proteasen angegriffen wird, und dadurch die unvollständigen Fusionsproteine sekundär aus den vollständigen Proteinen gebildet werden.

Beide Modelle (Kettenabbruch während der Translation

bzw. Transkription oder proteolytische Spaltung der reifen Fusionsproteine) können die Entstehung von unvollständigen Fusionsproteinen erklären. Beide Modelle werden zudem durch zwei Beobachtungen gestützt:

4 der 5 Vektorkonstruktionen (Ausnahme: Vektor 290-17-3; s.u.) werden in *E. coli* in Proteine von mindestens der Größe der β -Galaktosidase übersetzt. Verschiedene Vektorkonstruktionen, die an der Verknüpfungsstelle des 5'-Endes der HAV-cDNA übereinstimmen, aber sich in der Länge des HAV-cDNA-Anteils unterscheiden, werden in unreife Fusionsproteine identischer Länge übersetzt (s. Abb.21,d',e',f'). Beide Befunde deuten darauf hin, daß der β -Gal.-Anteil dieser Fusionsproteine sehr wahrscheinlich vollständig erhalten ist. Demnach sollten sich reife und unvollständige Fusionsproteine nur in ihrem HAV-Protein-Anteil unterscheiden.

Vektor 290-17-3 hat den höchsten HAV-cDNA-Anteil. Der resultierende hohe Fremdproteinanteil am C-terminalen Ende der β -Galaktosidase führt möglicherweise zu einer Destabilisierung des Enzyms, die es gegenüber Proteasen sensibilisiert. Auf diese Weise entstehen vermutlich die beobachteten HAV-VP1-spezifischen Proteine, die kleiner als unfusionierte β -Galaktosidase sind.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß HAV-spezifische cDNA in *E. coli* in ein relativ stabiles Fusionsprotein mit dem Enzym β -Galaktosidase übersetzt werden kann. Im nächsten Abschnitt werden die antigenen Eigenschaften dieser Proteine näher beleuchtet.

6.3. Antigene Eigenschaften der HAV-VP1-Fusionsproteine

Die Translationsprodukte der 5 Expressionsvektoren wurden auf ihre Reaktivität gegen antiHAV-positive Seren getestet. In der gewählten Versuchsanordnung werden die Proteine vollständig denaturiert. Daher konnten nur Antikörper reagieren, die kontinuierliche, in erster Linie von der Proteinprimärstruktur determinierte Antigene erkennen. Vermutlich erkennt aber die Mehrheit der Antikörper, die von einem nativen Protein induziert werden, konformationsabhängige und diskontinuierliche (zusammengesetzte) Antigene (Berzofsky, 1985).

Dennoch gelang es Wychowski et al. (1983) mit einem neutralisierenden Monoklonalen Antikörper (MKA) ein kontinuierliches und konformationsunabhängiges Antigen zwischen Aminosäure 94 und 104 auf dem PV-Capsidprotein VP1 zu kartieren. Die Lage dieses neutralisierenden Antigens konnte durch die Kartierung von Varianten, die gegen neutralisierende MKA resistent geworden waren (Minor et al., 1983; Evans et al., 1983; Minor et al., 1985) und durch Charakterisierung von neutralisierenden anti-Virion MKA (Emini et al., 1983) bestätigt werden. Es ist also durchaus möglich und sinnvoll, immunogene Regionen des HAV-Strukturproteins VP1 durch Reaktion von antiHAV-positivem Serum mit denaturiertem Protein zu kartieren.

An dieser Stelle muß betont werden, daß die Tertiärstruktur der Capsidproteine VP1, VP2 und VP3 sowohl untereinander als auch im Vergleich zweier Genera der

Picornaviren miteinander und mit einem Pflanzenvirus im Kern konserviert ist: Der Großteil der Polypeptidkette liegt in β -Faltung vor, indem mehrere Segmente mit β -Struktur antiparallel angeordnet sind; die gegenläufigen β -Strukturen und wenige α -Helices sind an den Enden über Schleifen verbunden, die wichtige antigene Determinanten tragen (Rossman et al., 1985; Hogle et al., 1985). Die an PV und HRV studierte Tertiärstruktur der viralen Capsidproteine läßt eine im Prinzip vergleichbare Proteinfaltung der HAV-Capsidproteine vermuten.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß das C-terminale Ende von HAV-VP3 und/oder der Bereich nahe dem Amino-terminus von HAV-VP1 im denaturierten Zustand mit antiHAV-positivem Kaninchenserum reagieren (Das Serum wurde durch mehrmalige subkutane Verabreichung von gereinigten HAV-Partikeln hergestellt). Der mittlere Abschnitt (ab ca. Aminosäureposition 60) und das carboxyterminale Ende von VP1 binden dagegen keine Antikörper aus dem antiHAV-positiven Kaninchenserum.

Die eben erläuterten Röntgenstrukturdaten von PV und HRV lassen zunächst vermuten, daß der VP3-Anteil für die Antikörperbindung mitverantwortlich ist, da der C-Terminus von HAV-VP3 vermutlich an der Capsidoberfläche liegt. Bisher konnte jedoch dem C-terminalen Ende von VP3 weder im Polio-, noch im Rhino- oder FMDV-System eine Funktion bei der Bindung von neutralisierenden Antikörpern zugewiesen werden. Auf der anderen Seite deuten viele Befunde auf eine Beteiligung von Protein VP1 der Picornaviren an der Virusneutralisation hin: So wurde am Beispiel von PV (Jameson, 1984) und HAV (Emini et al., 1985) gezeigt, daß synthetische Peptide,

die einen Bereich in der Nähe des N-Terminus von VP1 repräsentieren, in der Lage sind, neutralisierende Antikörper zu induzieren oder für diese zu "primen" (vgl. Einleitung). Emini et al. (1985) zeigten auch, daß das Hydrophilizitätsprofil von HAV-VP1 sehr gut mit der von der Aminosäuresequenz des PV-VP1 abgeleiteten Kurve korreliert und am N-terminalen Ende von HAV-VP1 auf Grund relativ hoher Hydrophilizität eine antigene Determinante erwarten läßt. Auch die häufig zur Lokalisierung von antigenen Determinanten herangezogene intertypische Variabilität deutet darauf hin, daß am N-Terminus von PV-VP1, aber nicht am C-Terminus von VP3 eine Antikörperbindungsstelle liegt: Die Aminosäuresequenzen der 3 Serotypen von PV differieren am N-Terminus von VP1 relativ stark, am C-Terminus von VP3 dagegen nur unwesentlich (Toyoda et al., 1984).

Im vorangegangenen Abschnitt (6.2.) wurde die Beobachtung diskutiert, daß nach Expression einiger der untersuchten Vektoren neben den vollständigen Fusionsproteinen vermutlich durch vorzeitige Termination der Translation (oder der Transkription) entstandene unreife Fusionsproteine nachgewiesen werden können. Vektor 290-17-7 wird in *E. coli* in das reife Fusionsprotein, daneben aber auch in unreife Proteine übersetzt. Eine Schätzung des Molekulargewichts eines dieser unreifen Fusionsproteine zeigte, daß dieses Protein, wenn es den C-Terminus der β -Galaktosidase besitzt, aus der β -Galaktosidase und einem HAV-VP3-spezifischen Abschnitt besteht, aber keinen HAV-VP1-spezifischen Abschnitt besitzt. Dieses unreife Fusionsprotein ist nicht in der Lage, im "Westernblot"-Ver-

fahren Antikörper aus dem antiHAV-positiven Kaninchenserum zu binden. Ein unreifes Fusionsprotein mit höherem Molekulargewicht und das reife Fusionsprotein (beide sollten den N-Terminus von HAV-VP1 enthalten) reagieren dagegen positiv mit diesem Serum.

Die bisher diskutierten Resultate wurden mit antiHAV-positivem Kaninchenserum gewonnen. Auch antiHAV-positives humanes Rekonvaleszenten-Serum wurde im "Westernblot" gegen die HAV-Fusionsproteine getestet: Keines der Fusionsproteine war in der Lage, Antikörper aus diesem Serum zu binden. Das Ergebnis kann einmal ein Hinweis auf die Konformationsabhängigkeit der Erkennung von Antigenen des HAV-Capsids durch Antikörper eines humanen antiHAV-positiven Serums sein. Auf der anderen Seite sind weitere Versuche zur Absicherung des Resultats nötig, da durchaus individuelle Unterschiede in Art und Ausmaß der Immunantwort auf ein Antigen, verursacht etwa durch Eigenheiten in der Art des Antigen-Prozessierens oder Unterschiede im Antikörper-repertoire, auftreten können (Berzofsky, 1985).

Die β -Gal.-(VP3/VP1)-Fusionsproteine wurden schließlich einem Radioimmuno-Assay zum Nachweis von Hepatitis A-Antigen (HAAG-RIA) unterworfen. Wiederum konnte keines der Fusionsproteine Antikörper (die aus antiHAV-positivem Humanserum isoliert wurden) binden. Später wurde gezeigt, daß die untersuchten Fusionsproteine im Versuchsansatz wie die meisten bisher untersuchten β -Galaktosidase-Fusionsproteine (Harris, 1983;S.164 f) praktisch unlöslich sind. Geringe Mengen von gelöstem Fusionsprotein könnten aus folgenden Gründen in der

Antikörperbindung versagt haben:

- a) Im Zytoplasma von *E.coli* werden keine Disulfidbrücken geknüpft, die, wie aus der Übereinstimmung der Cystein-Positionen in der Aminosäuresequenz der 3 PV-Typen geschlossen wurde, entscheidend zur Stabilisierung der dreidimensionalen Struktur von PV-VP1 beitragen (Toyoda et al., 1984).
- b) In HAAG-RIA können nur Proteine mit mindestens 2 antigenen Determinanten entdeckt werden, da es sich um einen "Sandwich"-Test handelt; Proteine mit nur einem Antikörper bindenden Antigen bleiben unerkannt.
- c) Wenn die antigenen Determinanten des getesteten Proteins eine Antikörperminorität binden, dann werden diese Determinanten ebenfalls im RIA unentdeckt bleiben.

Die Untersuchung der antigenen Eigenschaften der im letzten Abschnitt (6.2.) vorgestellten Fusionsproteine läßt sich dahingehend interpretieren, daß am aminoterminalen Ende von HAV-VP1 (und evtl. am C-Terminus von VP3) ein Antigen im denaturierten Zustand von anti-HAV-positivem Kaninchenserum erkannt wird. Der Bereich zwischen Aminosäureposition 60 (vom N-Terminus) und dem C-terminalen Ende dieses Capsidproteins bindet im denaturierten Zustand keine Antikörper aus diesem Serum.

7. ZUSAMMENFASSUNG

In PLC/PRF/5-Zellen vermehrtes HAV (Isolat MBB) wurde gereinigt, die virale RNA isoliert und in cDNA revers transkribiert. Als Primer dienten oligo(dT) und cDNA-Fragmente. Die HAV-cDNA wurde in *E. coli* kloniert und die cDNA-Klone physikalisch kartiert. Die Restriktionskarte der HAV-cDNA-Klone repräsentiert annähernd das gesamte HAV-Genom und korreliert mit einer Genomlänge von 7.5 Kb (+/- 2%). Ein Vergleich der Restriktionskarten dreier unabhängiger HAV-Isolate und des Isolats MBB ergibt eine Divergenz der Nukleotidsequenzen von jeweils etwa 4%.

HAV-cDNA aus dem Bereich des VP1-Gens wurde in *E. coli* exprimiert. Fünf z.T. überlappende cDNA-Fragmente wurden in einem Expressionsvektor mit dem β -Galaktosidasegen verknüpft und in ein β -Gal.-VP1- oder ein β -Gal.-VP3/VP1-Fusionsprotein übersetzt. Die fusionierten Gene wurden in jeweils mehrere Fusionsproteine übersetzt, die in der Regel ein höheres Molekulargewicht als β -Galaktosidase aufwiesen. Die Ableserate der fusionierten Gene war deutlich geringer als die des unfusionierten β -Gal.-Genes.

Die immunologische Charakterisierung der β -Gal.-Fusionsproteine erlaubte die Kartierung eines Bereiches der Capsidproteine von HAV, der Antikörper aus einem antiHAV-positiven Kaninchenserum konformationsunabhängig bindet: Nur das N-terminale Ende (Aminosäuren 1-ca.60) von HAV-VP1 bindet Antikörper aus diesem Serum,

nicht hingegen der mittlere Abschnitt und der C-Terminus von VP1. Eine Beteiligung des C-terminalen Endes von HAV-VP3 an dieser Antikörperbindung ist unwahrscheinlich, konnte aber nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

Die β -Gal.-(VP3//)VP1-Fusionsproteine waren nicht in der Lage, Antikörper aus antiHAV-positivem humanem Rekonvaleszenten-Serum spezifisch zu binden.

Gesamtzellprotein von Bakterien, die β -Gal.-(VP3//)VP1-Fusionsproteine synthetisieren, konnte in einem RIA keine signifikanten Mengen von antiHAV-Antikörpern (die aus antiHAV-positivem Humanserum stammen) binden.

Die Fusionsproteine konnten im nativen Zustand praktisch nicht gelöst werden.

8. VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

APS = Ammoniumpersulfat
B(p) = Basen(paare)
BSA = Bovine serum albumin
cDNA = komplementäre (complementary) DNA
CEF = Chicken embryo fibroblast
cpm = Counts per minute
DNA = Desoxyribonukleinsäure
DOC = Desoxycholat
ds = Doppelstrang (double strand)
DTT = Dithiothreitol
EB = Ethidiumbromid
EMC = Encephalomyocarditisvirus
FCS = Fötales Kälberserum
FMDV = Foot-and-mouth disease virus
HRV = Human rhinovirus
IPTG = Isopropylthiogalaktosid
Kb(p) = Kilobasen(paare)
Kd = Kilodalton
L.S. = Längenstandard
MEM = Minimal essential medium
MG = Molekulargewicht
MKA = Monoklonaler Antikörper
mRNA = messengerRNA
NC = Nitrozellulose
OD = Optische Dichte
PAGE = Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS = Phosphate buffered saline
PV = Poliovirus
RIA = Radioimmunoassay

RNA = Ribonukleinsäure
r.p.= "random primer"
R.T.= Reverse Transkriptase
SDS = Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE = SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
ss = Einzelstrang (single strand)
SSC = Standard saline citrat
TCA = Trichloressigsäure
TdT = Terminale desoxyNukleotid-Transferase
U = Units
Upm = Umdrehungen pro Minute
VP = Virales Protein

9. LITERATURVERZEICHNIS

Alexander, J., Macnab, G. and Saunders, R. (1978), in: Perspectives in Virology, 10, ed. Pollard, M. (Raven Press, New York), 103.

Argos, P., Kamer, G., Nicklin, M.J.H. and Wimmer, E. (1984): Similarity in gene organisation and homology between proteins of animal picornaviruses and a plant comovirus suggest common ancestry of these virus families. NAR, 12, 7251-7267.

Bachrach, H.L., Moore, D.M., McKercher, P.D. and Polatnick, J. (1975): Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of food-and-mouth disease virus. J. Immunol., 115, 1635.

Baltimore, D., Jacobson, M.F., Asso, J. and Huang, A. (1969): The formation of poliovirus proteins. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 34, 741-746.

Barinaga, M., Franco, R., Meinkoth, J., Ong, E. and Wahl, G.M. (1981): Methods for the transfer of DNA, RNA and protein to nitrocellulose and diazotized paper solid supports. Schleicher & Schuell, USA.

Baron, M.H. and Baltimore, D. (1982a): Antibodies against a synthetic peptide of the poliovirus replicase proteins: reaction with native, virus-coded protein and inhibition of virus-coded polymerase activities in vitro. J. Virol., 43, 969-978.

Baron, M.H. and Baltimore, D. (1982b): Purification and properties of a host cell protein required for poliovirus replication in vitro. *J. Biol. Chem.*, 257, 12351-12358.

Baroudy, B.M., Ticehurst, J.R., Miele, T.A., Maizel Jr, J.V., Purcell, R.H. and Feinstone, S.M. (1985): Sequence analysis of hepatitis A virus cDNA coding for capsid proteins and RNA polymerase. *PNAS*, 82, 2143-2147.

Bernstein, H.D., Sonenberg, N. and Baltimore, D. (1985): Poliovirus mutant that does not selectively inhibit host cell protein synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, 5, 2913-2923.

Berzofsky, J.A. (1985): Intrinsic and extrinsic factors in protein antigenic structure. *SCIENCE*, 229, 932-940.

Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G. and Lerner, R.A. (1982): Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 298, 30-33.

Blondel, B., Crainic, R. and Horodniceanu, F. (1982): Le polypeptide structural VP1 du poliovirus type 1 induit des anticorps neutralisants. *C. R. Acad. Sci.*, 294, 91.

Burnett, W.N. (1981): "Western Blotting", Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem., 112, 195-203.

Butterworth, B.E. and Korant, B.D. (1974): Characterization of the large picornaviral polypeptides produced in the presence of zinc ion. J. Virol., 14, 282-291.

Callahan, P.L., Mizutani, S. and Colonna, R.S. (1985): Molecular cloning and complete sequence determination of RNA genome of human rhinovirus type 14. PNAS, 82, 732-736.

Casey, J. and Davidson, N. (1977): Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentration of formamid. NAR, 4, 1539-1552.

Chow, M. and Baltimore, D. (1982): Isolated poliovirus capsid protein VP1 induces a neutralizing response in rats. PNAS, 79, 7518-7521.

Cooper, P.D., Agol, V.I., Bachrach, H.L., Brown, F., Ghendon, Y., Gibbs, A.J., Gellespie, J.H., Lonberg-Holm, K., Mandel, B., Melnick, J.L., Mohanty, S.B., Povey, R.C., Rueckert, R.R., Schaffer, F.C. and Tyrell, D.A. (1978): Picornaviridae: second report. Intervirology, 10, 165-180.

Coulepis, A.B., Locarnini, S.A., Westaway, E.G., Tannock, G.A. and Gust, I.D. (1982): Biophysical and Biochemical Characterization of Hepatitis A Virus. Intervirology, 18, 107-127.

Deinhardt, F. (1976): Hepatitis in primates. Adv. Virus Res., 20, 113-157.

Deinhardt, F. (1981): Ätiologie und Pathogenese der Virushepatitiden. In "Leber: Morphologie-Pathophysiologie-Klinik" (Herausgeber: L. Wannagat), Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.

Deinhardt, F. and Zuckerman, A.J. (1982): Virology of hepatitis A and B. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 36, 70-73.

Deng, G. and Wu, R. (1981): An improved procedure for utilizing terminal transferase to add homopolymers to the 3'-termini of DNA. NAR, 9, 4173-4188.

Dernick, R., Heukeshoven, J. and Hilbrig, M. (1983): Induction of neutralizing antibodies by all three structural poliovirus polypeptides. Virology, 130, 243.

Dugaiczky, A., Boyer, H.W. and Goodman, H.M. (1975): Ligation of Eco RI endonuclease generated DNA fragments into linear and circular structures. J. Mol. Biol., 96, 171-184.

Enger-Valk, B.E., Jore, J., Pouwels, P.H., van der Marel, P. and van Wezel, T.L. (1984): Expression in *Escherichia coli* of capsid protein VP1 of poliovirus type 1. In "Modern approaches to vaccines: Molecular and chemical basis of virus virulence and immunogenicity" (ed. R.M. Chanock and R.A. Lerner), 173-177, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Emini, E.A., Jameson, B.A., Lewis, A.J., Larsen, G.R. and Wimmer, E. (1982): Poliovirus neutralization epitopes: Analysis and localization with neutralizing monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 43, 997-1005.

Emini, E.A., Jameson, B.A. and Wimmer, E. (1983): Priming for and induction of anti-poliovirus neutralizing antibodies by synthetic peptides. *Nature*, 304, 699-703.

Emini, E.A., Jameson, B.A. and Wimmer, E. (1984): Identification of multiple neutralization antigenic sites on poliovirus type 1 and the priming of the immune response with synthetic peptides. In: *Modern Approaches to Vaccines* (Chanock, R.M. and Lerner, R.A., eds.), 65-75. Cold Spring Harbor Laboratory.

Emini, E.A., Hughes, J.V., Perlow, D.S. and Boger, J. (1985): Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. *J. Virol.*, 55, 836-839.

Evans, D.M.A., Minor, P.D., Schild, G.S. and Almond, J.W. (1983): Critical role of an eight-aminoacid sequence of VP1 in neutralization of poliovirus type 3. *Nature*, 304, 459-462.

Evans, D.M.A., Dunn, G., Minor, P.D., Schild, G.C., Cann, A.J., Stanway, G., Almond, J.W., Currey, K. and Maizel Jr, J.V. (1985): Increased neurovirulence associated with a single nucleotid change in a non-coding region of the Sabin type 3 poliovaccine genome. *Nature*, 314, 548-550.

Feinstone, S.M., Kapikian, A.Z. and Purcell, R.H. (1973): Hepatitis A: Detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *SCIENCE*, 182, 1026-1028.

Forss, S., Strebel, K., Beck, E. and Schaller, H. (1984): Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *NAR*, 12, 6587-6601.

Franssen, H., Leunissen, J., Goldbach, R., Lomonossov, G. and Zimmern, D. (1984): Homologous sequences in non-structural proteins from cowpea mosaic virus and picornavirus. *EMBO J.*, 3, 855-861.

Frösner, G.G., Overby, L.R., Flehmig, B., Gerth, H.J., Haas, H., Decker, R.H., Ling, C.M., Zuckerman, A.J., Frösner, H.R. (1977): Seroepidemiological investigation of patients and family contacts in an epidemic of hepatitis A. *Journal of Medical Virology* 1: 163-173.

Frösner, G.G., Deinhardt, F., Scheid, R., Gauß-Müller, V., Holmes, N., Messelberger, V., Siegl, G. and Alexander, J.J. (1979): Propagation of human hepatitis A virus in a hepatoma cell line. *Infection*, 7, 303-305.

Gauß-Müller, V., Frösner, G.G. and Deinhardt, F. (1981): Propagation of hepatitis A virus in human embryo fibroblasts. *J. Med. Virol.*, 7, 233-239.

Gerlich, W.H. and Frösner, G.G. (1983): Topology and immunoreactivity of capsid proteins in Hepatitis A virus. *Med. Microbiol. Immunol.*, 172, 101-106.

Grubman, M.J., Robertson, B.H., Morgan, D.O., Moore, D.M. and Dowbenko, D., (1984): Biochemical map of polypeptides specified by foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.*, 50, 579-586.

Grunstein, M. and Hogness, D. (1975): Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *PNAS*, 72, 3961-3965.

Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, 166, 557-580.

Hanecak, R., Semler, B.L., Anderson, C.W. and Wimmer, E. (1982): Proteolytic processing of poliovirus polypeptides: Antibodies to polypeptide P3-7c inhibit cleavage at glutamine-glycine pairs. *PNAS*, 79, 3973-3977.

Hardy, K., Stahl, S. and Kupper, H. (1981): Production in *Bacillus subtilis* of hepatitis B core antigen and of major antigen of foot-and-mouth disease virus. *Nature*, 293, 481-483.

Harris, T.J.R. (1983): Expression of eukaryotic genes in *E. coli*. In: *Genetic Engineering 4* (Williamson, R., ed.). Academic Press (London).

von der Helm, K. (1977): Cleavage of Rous sarcoma viral polypeptide precursor into internal structural proteins in vitro involves viral protein p15. *PNAS*, 74, 911-915.

von der Helm, K., Winnacker, E.L., Deinhardt, F., Frösner, G., Gauß-Müller, V., Bayerl, B., Scheid, R. and Siegl, G. (1981): Cloning of Hepatitis A Virus Genome. *Journal of Virological Methods*, 3, 37-43.

Hogle, J.M., Chow, M. and Filman, D.J. (1985): Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *SCIENCE*, 229, 1358-1365.

Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S. and VandePol, S. (1982): Rapid Evolution of RNA Genomes. *SCIENCE*, 215, 1577-1585.

Holmes, A.W., Wolfe, L., Rosenblate, H. and Deinhardt, F. (1969): Hepatitis in marmosets: Induction of disease with coded specimens from a human volunteer study. *SCIENCE*, 164, 816-817.

Hughes, J.V., Stanton, L.W., Tomassini, J.E., Long, W.J. and Scolnick, E.M. (1984): Neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis A virus: Partial localization of a neutralizing antigenic site. *J. Virol.*, 52, 465-473.

Hughes, J.V. and Stanton, L.W. (1985): Isolation and immunizations with hepatitis A Viral structural proteins: Induction of antiprotein, antiviral, and neutralizing responses. *J. Virol.*, 55, 395-401.

Jameson, B.A. (1984): "An analysis of poliovirus antigenic sites". Ph.D. thesis, State University of New York, Stony Brook.

Kazachkov, Y.A., Chernovskaya, T.V., Siyanova, E.Y., Svitkin, Y.V., Ugarova, T.Y. and Agol, V.I. (1982): Leader polypeptides encoded in the 5'-region of the encephalomyocarditis virus genome. *FEBS Lett.*, 141, 153-156.

Kew, O.M. and Nottay, B.K. (1984): Evolution of the oral polio vaccine strains in human occurs by both mutation and intramolecular recombination. In: *Modern Approaches to Vaccines* (Chanock, R.M. and Lerner, R.A., eds.), 357-361. Cold Spring Harbor Laboratory.

King, A.M.Q., Underwood, B.O., McCahon, D., Newman, J.W.I. and Brown, F. (1981): Biochemical identification of viruses causing the 1981 outbreaks of food-and-mouth disease in the U.K. *Nature*, 293, 479-480.

King, A.M.Q., McCahon, D., Slade, W.R. and Newman, J.W.I. (1982): Recombination in RNA. *Cell*, 29, 921-928.

Kitamura, N., Semler, B.L., Rothberg, P.B., Larsen, G.R., Adler, C.J., Dorner, A.J., Emini, E.A., Hanecak, R., Lee, J.J., van der Werf, S., Anderson, C.W. and Wimmer, E. (1981): Primary structure, gene organization and polypeptide expression of poliovirus RNA. *Nature*, 291, 547-553.

Kleid, D.G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D.M., Grubman, M.J., McKercher, P.D., Morgan, D.O., Robertson, B.H. and Bachrach, H.L. (1981): Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: Responses in cattle and swine. *SCIENCE*, 214, 1125-1129.

Koch and Koch (1985): *The Molecular Biology of Poliovirus*. Springer-Verlag Wien New York.

Küpper, H., Keller, W., Kurz, C., Forss, S., Schaller, H., Franze, R., Strohmaier, K., Marquardt, O., Zaslavsky, V.G. and Hofschneider, H.P. (1981): Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus and expression in *E. coli*. *Nature*, 289, 555-559.

Krugman, S. (1982): Hepatitis virus vaccines: Present status. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 55, 375-381.

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.

Laporte, J., Grosclaude, J., Wantyghem, J., Bernard, S. and Rouze, P. (1973): Neutralization en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par les serums provenant de porcs immunisée a l'aide d'une protéine virale purifiée. C.R.Hebd.Seances Acad. Sci. Ser. D., 276, 3399.

Linemeyer, D.L., Menke, J.G., Martin-Gallardo, A., Hughes, J.V., Young, A. and Mitra, S.W. (1985): Molecular cloning and partial sequencing of Hepatitis A viral cDNA. J. Virol., 54, 247-255.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

van der Marel, P., Hazendonk, T.G., Henneke, M.A.C. and van Wezel, A.L. (1983): Induction of neutralizing antibodies by poliovirus polypeptides VP1, VP2 and VP3. Vaccine, 1, 17.

Maxam, A.M. and Gilbert, W. (1980): Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. Methods Enzymol., 65, 499.

Melnick, J.L. (1982): Classification of hepatitis A virus as enterovirus type 72 and of hepatitis B virus as hepadnavirus type 1. Intervirology, 18, 105-106.

Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B. and Hofschneider, P.H. (1977): Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a Hind II fragment of the lac regulatory region in the M13 replicative form in vitro. PNAS, 75, 3642-3646.

Minor, P.D., Schild, G.C., Bootman, J., Evans, D.M.A., Ferguson, M., Reeve, P., Spitz, M., Stanway, G., Cann, A.J., Hauptmann, R., Clarke, L.D., Mountford, R.C. and Almond, J.W. (1983): Location and primary structure of a major antigenic site for poliovirus neutralization. Nature, 301, 674-679.

Minor, P.D., Evans, D.M.A., Ferguson, M., Schild, G.C., Westrop, G. and Almond, J.W. (1985): Principal and subsidiary antigenic sites of VP1 involved in the neutralization of poliovirus type 3. J. gen. Virol., 65, 1159-1165.

Miyanojara, A., Toh-e, A., Nozaki, C., Hamada, F., Ohtomo, N. and Matsubara, K. (1983): Expression of hepatitis B surface antigen gene in yeast. PNAS, 80, 1-5.

Moore, N.F., Reavy, B. and King, L.A. (1985): General characteristics, gene organization and expression of small RNA viruses of insects. J. gen. Virol., 66, 647-659.

Mosley, J.W. (1983): Hepatitis A virus infection. Eur. J. Clin. Microbiol., 2, 59-79.

Najarian, R., Caput, D., Gee, W., Potter, S.J., Renard, A., Merryweather, J., Van Nest, G. and Dina, D. (1985): Primary structure and gene organization of human hepatitis A virus. PNAS, 82, 2627-2631.

Nei, M. and Li, W.-H. (1979): Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases.

PNAS, 76, 5269-5273.

Norlander, J., Kempe, T. and Messing, J. (1983): Improved M13 vectors using oligonucleotide-directed mutagenesis. Gene, 26, 101-106.

Pallansch, M.A., Kew, O.M., Semler, B.L., Omilianowski, D.R., Anderson, C.W., Wimmer, E. and Rueckert, R.R. (1984): Protein processing map of poliovirus. J. Virol., 49, 873-880.

Peacock, S.L., McIver, C.M. and Monahan, J.J. (1981): Transformation of E. coli using homopolymer-linked plasmid chimeras. Biochim. Biophys. Acta, 655, 243.

Provost, P.J. and Hilleman, M.R. (1979): Propagation of human hepatitis A virus in cell culture in vitro. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 160, 213-221.

Purcell, R.H., Feinstone, S.M., Daemer, R.J., Ticehurst, J.R. and Baroudy, B.M. (1984): Approaches to the development of hepatitis A vaccines: The old and the new. In "Modern approaches to vaccines: Molecular and chemical basis of virus virulence and immuno-

genicity" (ed. R.M. Chanock and R.A. Lerner), 59-63, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Putnak, J.R., and Phillips, B.A. (1981): Picornaviral Structure and Assembly. Microbiol. Reviews, 45, 287-315.

Rigby, P.W.J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P. (1977): Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol., 113, 237-251.

Robinson, M., Lilley, R., Little, S., Emtage, J.S., Yarranton, G., Stephens, P., Millican, A., Eaton, M. and Humphreys, G. (1984): Codon usage can affect efficiency of translation of genes in Escherichia coli. NAR, 12, 6663-6671.

Rossmann, M.G., Arnold, E., Erickson, J.W., Frankenberger, E.A., Griffith, J.P., Hecht, H.-J., Johnson, J.E., Kamer, G., Luo, M., Mosser, A.G., Rueckert, R.R., Sherry, B. and Vriend, G. (1985): Structure of a human common cold virus and functional relationship to other picornaviruses. Nature, 317, 145-153.

Rueckert, R.R. (1976): On the structure and morphogenesis of picornaviruses. In "Comprehensive Virology" (H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner, eds.) Vol. 6, 131-213, Plenum, New York.

Rueckert, R.R. and Wimmer, E. (1984): Systematic Nomenclature of Picornavirus Proteins. J. Virol., 50, 957-959.

Rüther, U. and Müller-Hill, B. (1983): Easy identification of cDNA clones. EMBO, 2, 1791-1794.

Sabin, A.B. and Boulger, L.R. (1973): History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. J. Biol. Stand., 1, 115-118.

Salk, J.E. (1953): Principles of immunization as applied to poliomyelitis and influenza. Am. J. Pub. Health, 43, 1384-1398.

Sangar, D.V. (1979): The replication of picornaviruses. J. Gen. Virol., 45, 1-13.

Schild, G.C., Minor, P.D., Evans, D.M.A., Ferguson, M., Stanway, G. and Almond, J.W. (1984): Molecular basis for the antigenicity and virulence of poliovirus type 3. In: Modern Approaches to Vaccines (Chanock, R.M. and Lerner, R.A., eds.), 27-35. Cold Spring Harbor Laboratory.

Schleif, R.F. and Wensink, P.C. (1981): Practical methods in molecular biology. Springer-Verlag, New York-Heidelberg-Berlin.

Siegl, G., Frösner, G.G. (1978): Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. II. Type and configuration of nucleic acid. J. Virol. 26, 48-53.

Southern, E.M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 38, 503-517.

Summers, D.F. and Maizel, J.V. Jr. (1968): Evidence for large precursor proteins in poliovirus synthesis. PNAS, 59, 966-971.

Swamy, K.H.S. and Goldberg, A.L. (1981): E. coli contains eight soluble proteolytic activities, one being ATP dependent. Nature, 292, 652-654.

Takegami, T., Semler, B.L., Anderson, C.W. and Wimmer, E. (1983): Membrane Fractions Active in Poliovirus Replication Contain VPg Precursor Polypeptides. Virology, 128, 33-47.

Thomas, P.S. (1980): Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. PNAS, 77, 5201-5205.

Ticehurst, J.R., Racaniello, V.R., Baroudy, B.M., Baltimore, D., Purcell, R.H. and Feinstone, S.M. (1983): Molecular cloning and characterization of hepatitis A virus cDNA. PNAS, 80, 5885-5889.

Tobwin, H., Stahelin, T. and Gordon, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. PNAS, 76, 4350-4354.

Toyoda, H., Kohara, M., Kataoka, Y., Suganuma, T., Omata, T., Imura, N. and Nomoto, A. (1984): Complete Nucleotide Sequences of All Three Poliovirus Serotype Genomes. J. Mol. Biol., 174, 561-585.

Tratschin, J.D., Siegl, G., Frösner, G.G. and Deinhardt, F. (1981): Characterization and classification of virus particles associated with hepatitis A. III. Structural proteins. J. Virol., 38, 151-156.

Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W.J., Ammerer, G. and Hall, B.D. (1982): Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. Nature, 298, 347.

van der Werf, S., Dreano, M., Bruneau, P., Kopecka, H. and Girard, M. (1983): Expression of poliovirus capsid polypeptide VP1 in Escherichia coli. Gene, 23, 85-93.

Wimmer, E. (1982): Genome-Linked Proteins of Viruses. Cell, 28, 199-201.

Winnacker, E.L. (1984): Gene und Klone, eine Einführung in die Gentechnologie. Verlag Chemie GmbH, Weinheim.

Wychowski, C., van der Werf, S., Siffert, O., Crainic, R., Bruneau, P. and Girard, M. (1983): A poliovirus type 1 neutralization epitope is located within amino-acid residues 93 to 104 of viral capsid polypeptide VP 1. EMBO J., 2, 2019-2024.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene, 33, 103-119.

Yanofsky, C. (1981): Attenuation in the control of expression of bacterial operons. Nature, 289, 751-758.

DANKSAGUNG

Am Ende der Arbeit möchte ich allen Mitarbeitern des Max-von-Pettenkofer Instituts danken, die an der Entstehung der Arbeit beteiligt waren.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Priv.Doz. Dr. Klaus von der Helm für die Aufgabenstellung und die Betreuung der Arbeit sowie für stete Diskussionsbereitschaft.

Frl. Susanne Hittmair und Herrn David Kingsbury für hervorragende Assistenz.

Frau Verena Gauß-Müller für die zur Verfügung gestellten Seren, sowie für Poliovirus-RNA und HAV-RNA.

Herrn Manfred Motz und Herrn Rudolf Seibl für die zur Verfügung gestellten Vektoren pUC18 und pUR290 sowie für diverse E. coli-Stämme.

LEBENS LAUF

- 1955 geboren am 15. Juni in Habertshausen
- 1961-1965 Volksschule in Jetzendorf/Ilm
- 1965-1974 Besuch des Schyren-Gymnasiums in Scheyern und Pfaffenhofen/Ilm
- 1974 Abitur
- 1974-1975 Wehrdienst
- 1975-1980 Studium der Biologie an der LMU in München
- 1980-1981 Diplomarbeit am Genetisch-Mikrobiologischen Institut in München; Abschluß des Studiums mit dem Diplom in Biologie
- 1981-1982 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Genetisch-Mikrobiologischen Institut
- 1983-1986 Doktorarbeit am Max-von-Pettenkofer Institut der LMU in München
- 1986 Eheschließung mit Dorothea Schapfl
- 1986 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Pathologischen Institut der LMU in München

